

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Lukáš Vidrna

Příprava neuroaktivních steroidů pro studium NMDA receptorů

Preparation of neuroactive steroids for study of NMDA receptors

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc

Konzultantka: RNDr. Hana Chodounská, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.5.2011

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi s vypracováním této diplomové práce. Velké díky patří paní RNDr. Haně Chodounské, CSc. za cenné rady a laskavé odborné vedení, dále pak školiteli na katedře biochemie prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. Poděkování patří také Mgr. Vojtěchu Kaprasovi za odbornou pomoc a velkou trpělivost při všemožných situacích a při interpretaci vodíkových spekter. Za interpretaci infračervených spekter děkuji Ing. Pavlu Fiedlerovi. RNDr. Ladislavu Kohoutovi, DrSc., Ing. Barboře Slavíkové, Ing. Jaroslavě Hniličkové, Mgr. Aleně Slavíčkové a celému týmu Medicinálních steroidů děkuji za přátelskou pracovní atmosféru. A nakonec bych rád poděkoval také Oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i., jmenovitě panu MUDr. Ladislavu Vyklickému, Jr., DrSc, Mgr. Vojtěchu Vyklickému a Mgr. Jiřině Borovské. Na úplný závěr bych chtěl poděkovat své rodině za plnohodnotné zázemí a také své přítelkyni Lence Suché za neskutečnou trpělivost nejen při studiu a psaní této práce.

Abstrakt

Neurosteroidy jsou významnou skupinou látek ovlivňujících vzájemnou komunikaci nervových buněk. Podstatou jejich působení je rychlá alosterická modulace membránových receptorů pro přenašeče nervového signálu. Jedním z nejdůležitějších systémů ovlivňovaných neurosteroidy je NMDA receptor. Vazebné místo pro inhibiční steroidy na něm nebylo dosud nalezeno. Předkládaná práce je zaměřena na přípravu fluorescenčně značené fotoafinitní sondy, která může pomoci objasnit strukturu a umístění vazebného místa, a tím usnadnit nalezení účinných neuroprotektiv.

Byl připraven (20S)-20-Aido-5 β -pregnan-3 α -yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-ester (**8**), jehož základní struktura napodobuje endogenní neurosteroid, dále obsahuje fotolabilní azidoskupinu a kovalentně vázanou fluorescenční NBD část. Kromě zmíněného pregnanového derivátu byla syntetizována i další fotoafinitní sonda s modifikovaným steroidním skeletem - pyridinium 17 α -azido-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfát (**29**).

Na buňkách z linie HEK293 exprimující NMDA receptory o podjednotkovém složení NR1-1a/NR2B bylo metodou terčíkového zámku ověřeno, že oba připravené deriváty si zachovaly schopnost endogenního neurosteroidu inhibovat aktivovaný NMDA receptor. V experimentálním systému buněčné linie HEK293 byly stanoveny hodnoty IC₅₀ obou připravených látek **8** a **29**.

Klíčová slova: neuroaktivní steroid, NMDA receptor, fotoafinitní značení, metoda terčíkového zámku.

Abstract

Neurosteroids are an important group of substances that affect communication between neurons. They act as allosteric modulators of membrane receptors for neurotransmitters. One of the most important systems influenced by neurosteroids are NMDA receptors; however, a binding site(s) for their inhibition by steroids have not been found yet. This work is focused on the synthesis of fluorescently labeled photoaffinity probe, which may help explain the structure and location of binding site(s) and simplify the development of new neuroprotectives.

A structural analogue of the endogenous neurosteroid, (20*S*)-20-Azido-5 β -pregnan-3 α -yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-ester (**8**), was prepared. The structure of compound **8** includes photolabile azido group, as well as covalently bounded fluorescent NBD group. In addition, a photoaffinity probe with a modified steroid skeleton - pyridinium 17 α -azido-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfate (**29**) - was synthesized.

The ability of compound **8** and **29** to inhibit activated NMDA receptor has been verified for recombinant NR1-1a/NR2B receptors expressed in HEK293 cells using a patch-clamp technique. Additionally, the IC₅₀ values of compounds **8** and **29** have been calculated. (In Czech)

Key words: neuroactive steroid, NMDA receptor, photoaffinity labeling, patch-clamp technique.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
1. ÚVOD.....	4
1.1 Neurosteroidy	4
1.2 GABA _A receptory a jejich modulace neurosteroidy	5
1.3 NMDA receptory a jejich modulace neurosteroidy	6
1.3.1 Struktura NMDA receptoru a jeho vlastnosti.....	6
1.3.2 Mechanismus účinku inhibice NMDAR pregnanolon sulfátem.....	8
1.3.3 Mechanismus účinku potence NMDAR pregnanolonsulfátem	9
1.3.4 Vztah struktury steroidních látek a jejich účinku na NMDAR	9
1.4 Vliv neurosteroidů na chování.....	9
1.5 Glutamát jako „posel buněčné smrti“	10
1.6 Afinity a fotoafinitní značení	12
1.7 Metoda terčíkového zámku	15
1.7.1 Přísátí k buňce.....	16
1.7.2 Snímání z celé buňky	16
1.7.3 Snímání z vytrženého terčíku v konfiguraci „outside-out“ a „inside-out“	17
1.7.4 Snímání z perforovaného terčíku	18
1.8 Fluorescenční značení.....	18
1.8.1 Nevlastní fluorofory	19
1.9 Úvod do problematiky syntézy	20
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	26
3. MATERIÁL A METODY.....	27
3.1 Syntetická část.....	27
3.1.2 Příprava (20S)-20-Azido-5β-pregnan-3α-yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-esteru (8)	27
3.1.2 Příprava 17α-Azido-17α-methyl-17α-homo-5β-androstan-3α-yl 3-sulfát pyridiniové soli (29)	32
3.2 Elektrofyziologická část.....	34

3.2.1 Složení roztoků	34
3.2.2 Použité geny	34
3.2.3 Příprava plazmidové DNA	35
3.2.3.1 Transformace kompetentních buněk	35
3.2.3.2 Izolace plasmidu pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit	35
3.2.4 Magnetická transfekce HEK buněk	36
3.2.5 Snímání proudových odpovědí	36
3.2.5.1 Optická zařízení	36
3.2.5.2 Aplikace roztoků	36
3.2.6 Snímání a úprava proudových odpovědí	37
3.2.7 Zpracování naměřených dat	37
3.3 Elektrofyzilogická měření	39
3.3.1 Snímání proudové odpovědi při inhibici steroidem 8	39
3.3.2 Snímání proudové odpovědi při inhibici steroidem 29	40
4. VÝSLEDKY	41
4.1 Syntetická část	41
4.2 Elektrofyzilogická část	46
4.2.1 Příprava buněk linie HEK293 exprimující NMDA receptory	46
4.2.2 Hodnota IC ₅₀ pro steroid 8	46
4.2.3 Hodnota IC ₅₀ pro steroid 29	47
5. DISKUSE	49
6. SOUHRN	53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

Seznam použitých zkratek

3 α 5 α	20-oxo-5 α -pregnan-3 α -yl sulfát
3 α 5 β S	pyridinium pregnanolon sulfát, pyridinium 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát
Ac	acetyl
AMK	aminokyselina
CNS	centrální nervová soustava
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DEAD	diethyl-azodikarboxylát
DHEA	dehydroepiandrosteron, 3 β -hydroxy-androst-5-en-20-on
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát, 20-oxo-androst-5-en-3 β -yl sulfát sodná sůl
DMAP	2,5-dimethylaminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNS-Cl	dansyl chlorid
DPPA	difenylfosforyl azid
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GABA _A	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou, podtyp A
GABA _B	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou, podtyp B
HMPA	hexamethylfosforamid
KA	kyselina kainová
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	redukovaná forma koenzymu NAD
NBD-Cl	4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NMDAR	receptor pro kyselinu N-methyl-D-asparagovou
PS	pyridinium pregnenolon sulfát, pyridinium 20-oxo-pregn-5-en-3 α -yl sulfát
RT	laboratorní teplota (room temperature)
S _N 2	nukleofilní substituce typu 2
TFF	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

1. Úvod

1.1 Neurosteroidy

Steroidní sloučeniny jsou známy především jako sexuální hormony.

Steroidní hormony (estrogen, progesteron, cortisol) jsou hydrofobní, nerozpustné ve vodě, a proto je nutné pro transport krevním řečištěm navázání na specifické transportní proteiny. Po uvolnění do cílové buňky steroid difunduje plasmatickou membránou a je transportován k jádru, kde se naváže na specifický receptorový protein (Rec). Tento protein po navázání steroidu změní konformaci a vytváří homo- nebo heterodimery s ostatními hormon-receptorovými komplexy, které se vážou na DNA do oblasti zvané Hormone Response Elements (HREs). Receptory přitahují koaktivátory nebo korepresory a ovlivňují tak transkripci. Dochází k ovlivnění genové exprese. Z popsaného mechanismu účinku vyplývá dlouhá doba (hodiny až dny) potřebná k jeho vyvolání.¹

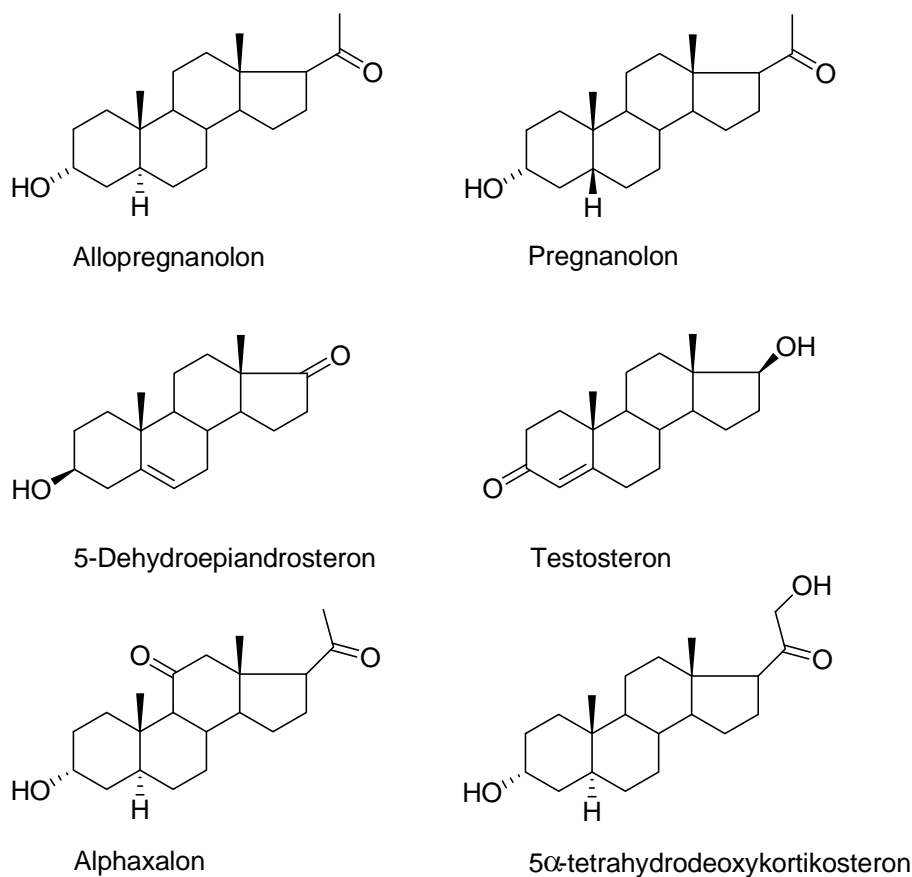
Na druhou stranu, od 40. let 20. století jsou známy steroidy, jejichž účinky jsou vyvolány v řádech sekund, ba dokonce milisekund. Přestože tento způsob modulace jako první pozoroval Hans Selye již v roce 1941, molekulární podstata zůstávala dlouho neznámá.² Objev rychlého efektu steroidu vedl k syntéze anestetika alphaxalonu. Teprve v roce 1976 Smaje při zkoumání účinku zmíněného alphaxalonu objevil souvislost mezi steroidy a receptory pro neuropřenašeče.³ V 80. letech byla popsána nejdříve modulace GABA_A receptorů endogenními steroidními látkami (neurosteroidy) a postupně i jejich vliv na další ligandem aktivované iontové kanály.²

Neurosteroidy jsou látky, které vznikají z cholesterolu nebo jiných steroidních prekurzorů přímo v nervových buňkách (allopregnanolon, dehydroepiandrosteron, pregnanolon). Termín neuroaktivní steroidy je používán pro steroidní látky s podobnými účinky, které však nevznikají přímo v nervových buňkách (alphaxalon, testosteron). Jejich struktury jsou znázorněny na **Obr. 1** (str. 5, jsou použity triviální názvy, s nimiž se lze setkat především v lékařské a biochemické literatuře). Často se však v literatuře setkáme s prolínáním těchto dvou výše uvedených termínů, přičemž většinou se užívá termín neuroaktivní steroidy, který zahrnuje i vlastní neurosteroidy.³

Neuroaktivní steroidy patří k fyziologicky a farmakologicky významné skupině látek. Vhodné deriváty by se výhledově mohly uplatnit při léčbě neurologických a psychiatrických onemocnění. Dosud nejvíce prozkoumanou oblastí je účinek

neuroaktivních steroidů na GABA_A receptory. Bylo však zjištěno, že mají vliv i na inhibici napěťově řízeného vápníkového kanálu a NMDA receptorů. A stále se objevují články, popisující nově zjištěná fakta o interakci dalších druhů a poddruhů neuronových receptorů s neuroaktivními steroidy.

Data z preklinických i klinických studií potvrdila potenciál neuroaktivních steroidů jako nové třídy léčiv pro ovlivnění epilepsie, úzkosti, nespavosti, migrény a drogové závislosti.⁴



Obr. 1 Základní struktury neurosteroidů a neuroaktivních steroidů

1.2 GABA_A receptory a jejich modulace neurosteroidy

Kyselina γ -aminomáselná (anglicky Gama Amino Butyric Acid) je hlavním inhibičním neuropřenašečem v savčí nervové soustavě. Název GABA receptor je odvozen právě od tohoto neuropřenašeče.² Existují 3 podskupiny receptorů, na které GABA působí:

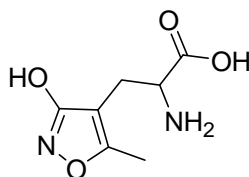
1. ionotropní GABA_A receptory – přímo tvořící kanál pro Cl⁻ ionty
2. metabotropní GABA_B receptory – pomocí G-proteinů spřažené s Na⁺ a K⁺ kanály
3. GABA_C receptory – tvoří také kanál pro Cl⁻ ionty, od GABA_A se liší svými podjednotkami a farmakologickými vlastnostmi.

Již zmíněný alphaxalon je příklad neurosteroidu, který ovlivňuje právě GABA receptory, konkrétně GABA_A receptor. Alphaxalon byl první látkou, u níž se podařilo prokázat spojitost mezi neurosteroidem a GABA_A receptorem. Mezi další látky, které GABA receptory ovlivňují, patří např. allopregnanolon, tetrahydrodeoxykorikosteron (**Obr. 1**, str. 5).²

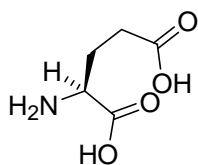
1.3 NMDA receptory a jejich modulace neurosteroidy

1.3.1 Struktura NMDA receptoru a jeho vlastnosti

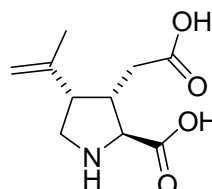
NMDA receptory patří do rodiny ionotropních (ligandem řízených iontových kanálů) receptorů aktivovaných glutamátem. Glutamát je nejrozšířenějším excitačním neurotransmiterem v CNS obratlovců, polovina všech synapsí je glutamatergních. Do této rodiny dále patří AMPA receptory (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové receptory) a kainátové receptory (KA receptory).² Tyto názvy jsou odvozeny od jejich specifických syntetických agonistů, jejichž struktura je znázorněna na **Obr. 2**.



Kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová



Kyselina glutamová



Kyselina kainová

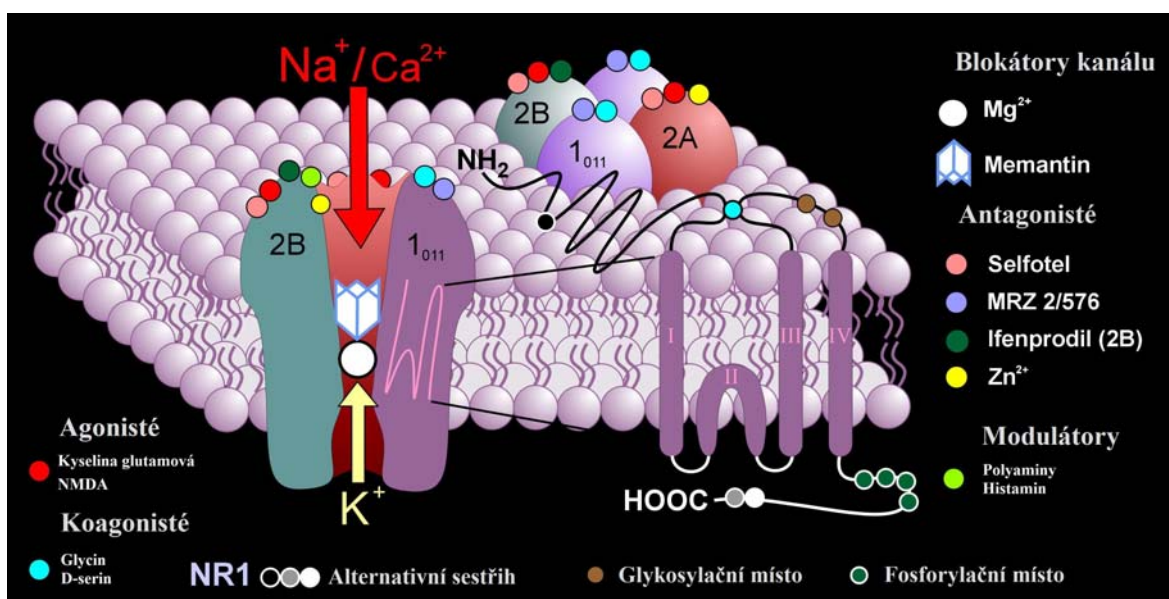
Obr. 2 Syntetické funkční analogy kyseliny glutamové aktivující neuronové receptory

NMDA receptor má klíčovou roli díky svým jedinečným vlastnostem, jako je:

1. Vysoká propustnost pro Ca^{2+} ionty, ovlivňující řadu intracelulárních procesů.
2. Aktivace dvěma endogenními agonisty (glutamátem a glycinem) zároveň.
3. Blokace kanálu Mg^{2+} ionty v závislosti na napětí membrány.²

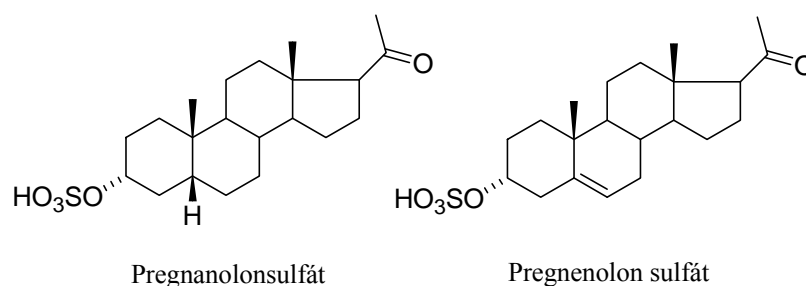
Podobně jako jiné iontové kanály má i NMDA receptor oligomerní strukturu. Dosud bylo objeveno a klonováno 7 podjednotek NMDA receptoru - NR1, NR2A-D a NR3A-B. Současná představa o NMDA receptoru je taková, že hlavní strukturou je tetrametr složený ze dvou NR1 a dvou NR2 podjednotek. NR3 podjednotka někdy může

nahradit jednu ze dvou NR2 podjednotek, potom v kombinaci s NR1 podjednotkou tvoří excitační glycinové receptory.² Předpokládaná struktura NMDA receptoru je znázorněna na **Obr. 3**.⁵



Obr. 3 Struktura NMDA receptoru⁵

Přítomnost sulfátové skupiny, která je nositelem záporného náboje, v poloze C-3, je společným znakem endogenních neurosteroidů, jež mají přímý vliv na NMDA receptor. Na **Obr. 4** jsou znázorněny struktury endogenních neurosteroidů – $3\alpha 5\beta S$ a PS. Je zajímavé, že tyto dvě látky lišící se přítomností dvojné vazby a konfigurací substituentu v poloze C-3 mají naprosto opačné účinky. A to jak v působení na $GABA_A$ receptory, tak na NMDA receptory. PS působí na $GABA_A$ receptor inhibičně, ale na NMDA receptor má výrazný potenciační efekt. $3\alpha 5\beta S$ působí na NMDA receptor inhibičně, na $GABA_A$ receptory má taktéž inhibiční vliv. Modulace, a to jak inhibiční, tak potenciační, těmito neurosteroidy spočívá v ovlivnění pravděpodobnosti otevření iontového kanálu.

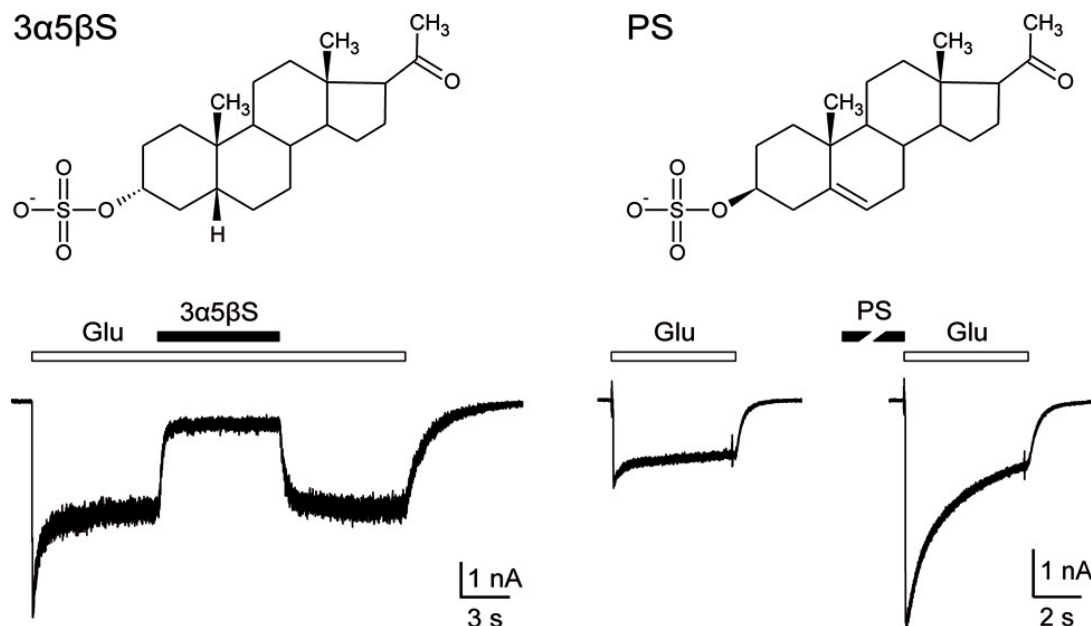


Obr. 4 Struktura endogenních neurosteroidů - $3\alpha 5\beta S$ a PS

1.3.2 Mechanismus účinku inhibice NMDAR pregnanolon sulfátem

3 α 5 β S je přirozeně se vyskytující neurosteroid v CNS savců, který má vliv na celou řadu iontových kanálů (NMDA, KA, GABA_A). Jeho působením na NMDA receptor se snižuje pravděpodobnost otevření iontového kanálu, tedy má inhibiční účinky. Jako příklad inhibice poslouží modelový pokus, kdy na hipokampální potkaní buňky byl po předchozí několikasekundové aplikaci glutamátu aplikován 100 μ M 3 α 5 β S. Po aplikaci 3 α 5 β S došlo ke snížení odpovědi o 70 % (**Obr. 5**). Bylo připraveno mnoho steroidních derivátů, které mají inhibiční účinek, a u kterých se předpokládá vazba do stejného místa jako 3 α 5 β S. Velmi důležitou informací, jež nám zatím zůstává skryta, je nalezení tohoto vazebného místa a objasnění mechanismu modulace 3 α 5 β S NMDAR. Tento objev by mohl vést k cílené syntéze takových neuromodulátorů, které by mohly zásadním způsobem ovlivnit funkci NMDAR.⁷

Zatím bylo zjištěno, že 3 α 5 β S působí v extracelulární části a že nedochází ke kompetitivní inhibici vazebného místa pro glutamát. Dále bylo zjištěno, že 3 α 5 β S nepůsobí jako blokátor kanálu, jako např. Mg²⁺ nebo memantin. 3 α 5 β S však inhibuje pouze takové NMDAR, které již předtím byly agonistou aktivovány – preaplikace 3 α 5 β S před glutamátem žádný efekt nevyvolává.⁷



Obr. 5 Struktura a účinek neurosteroidů 3 α 5 β S a PS. Záznamy elektrofyzilogických měření proudových odpovědí HEK293 buněk s exprimovanými NR1/NR2B receptory na

aplikaci glutamátu a příslušného steroidu ukazují inhibiční vliv $3\alpha5\beta\text{S}$ ($100\text{ }\mu\text{M}$) a potenciační vliv PS ($200\text{ }\mu\text{M}$) na proudové odpovědi vyvolané aplikací 1 mM glutamátu.⁷

1.3.3 Mechanismus účinku potenciace NMDAR pregnenolonsulfátem

PS je jedním z nejhojnějších *de novo* syntetizovaných neurosteroidů. Předpokládá se, že zvyšuje pravděpodobnost otevření iontového kanálu. Saturační koncentrace PS vede ke čtyřnásobné potenciaci odpovědi receptorů složených z NR1/NR2A a z NR1/NR2B. Potenciační účinek překvapivě vzroste, pokud PS aplikujeme dříve než agonistu. Naopak potenciace výrazně klesá u koaplikace s agonistou, kdy dochází pouze k malému zvýšení odpovědi NMDAR. Tyto výsledky lze vysvětlit například tak, že po aplikaci agonisty, tedy aktivaci receptoru, dochází ke snížení afinity receptoru k PS.⁷

Bylo ukázáno, že mechanismus působení tohoto steroidu je mnohem komplexnější, neboť z výsledků elektrofyzilogického měření vyplývá, že PS potencuje NMDAR o podjednotkovém složení NR1/NR2A-B, ale receptory s podjednotkovým složením NR1/NR2C-D inhibuje.⁷

1.3.4 Vztah struktury steroidních látek a jejich účinku na NMDAR

Jak již bylo uvedeno, $3\alpha5\beta\text{S}$ a PS liší se na první pohled nepatrně, pouze přítomností dvojné vazby a konfigurací na C-3, mají natolik odlišné účinky, že bylo připraveno mnoho derivátů, které by napomohly objasnit strukturní determinaci vazebného místa.⁸ Testované látky byly deriváty jak $3\alpha5\beta\text{S}$, tak PS, s různými substituenty v poloze C-3 a C-7. Z výsledků měření aktivit těchto látek vyplynulo, že žádná z nich není účinnější inhibitor než endogenní $3\alpha5\beta\text{S}$ ($\text{IC}_{50} = 47\text{ }\mu\text{M}$). Prakticky totožnou hodnotu IC_{50} měl pregnanolon hemisukcinát ($\text{IC}_{50} = 52\text{ }\mu\text{M}$).

Substituce v poloze C-7 zbytkem kyseliny octové či nikotinové také zvyšovala hodnotu IC_{50} .⁸

1.4 Vliv neurosteroidů na chování

Dosavadní poznatky o působení neurosteroidů na ionotropní receptory potvrzují jejich fyziologický a hlavně terapeutický význam. Řada behaviorálních studií poukázala na jejich vliv na reakci na stres, agresivitu, úzkost nebo také při vytváření paměti a schopnosti učení. Stres je u pokusných zvířat, a nejspíše i u lidí, důsledkem rychlého, ale reverzibilního poklesu aktivity GABA_A receptorů. Tento pokles je doprovázen zvýšením hladiny neurosteroidů, jež pozitivně modulují právě GABA_A receptory ($3\alpha5\alpha$).

U NMDA receptorů, u nichž je prokázána jejich účast právě při tvorbě paměti, dochází při podání sulfatovaných pozitivně modulujících neurosteroidů (PS, DHEAS) u experimentálních zvířat k výraznému zlepšení kognitivních schopností. Také se podařilo prokázat souvislost mezi sníženou hladinou PS v hipokampu u starších potkanů a jejich sníženými výkony v paměťových testech a podstatné přechodné zlepšení při injekčním podání PS buď intraperitoneálně, nebo intrahipokampálně.

Předpokládá se, že právě neurosteroidy pozitivně ovlivňují kognitivní schopnosti prostřednictvím modulace GABA_A receptorů a NMDA receptorů.

1.5 Glutamát jako „posel buněčné smrti“

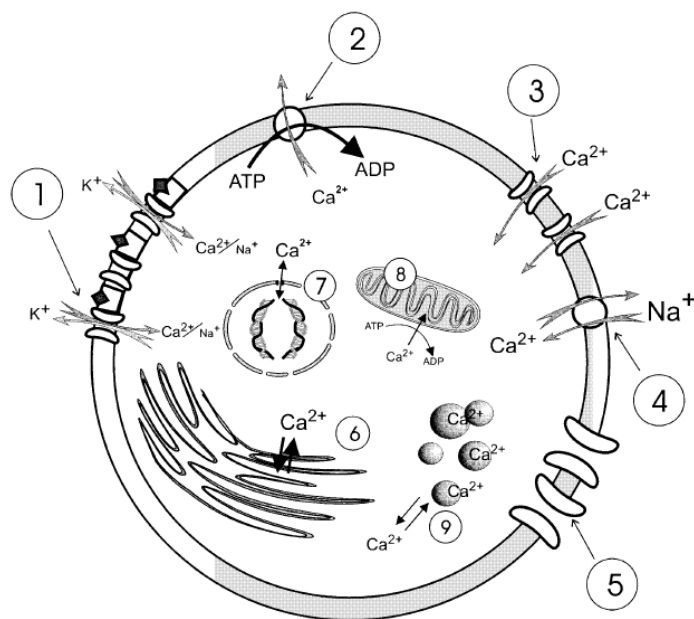
Při poranění mozku či mozkové mrtvici některé mozkové buňky zahynou v přímém důsledku nedostatku kyslíku. Větší rozsah poškození je však způsoben následnými chemickými procesy, které vedou k buněčné smrti. Tyto děje jsou vyvolány vyloučením nadbytku glutamátu do okolí poškozených a umírajících buněk. Hyperexcitace nebo aktivace NMDA receptorů způsobí zvýšený vstup Ca²⁺ iontů do buňky.

Vápenaté ionty jsou všudypřítomní intracelulární poslové, regulující mnoho buněčných funkcí jako např. buněčný růst, diferenciaci, membránovou vzrušivost, synaptickou aktivitu a exocytosu. Proto je nezbytně nutné, aby neurony udržovaly stálou hladinu Ca²⁺ iontů v cytosolu. V neuronech se vyvinul komplex homeostatických mechanismů, které regulují jak cytosolickou koncentraci Ca²⁺, tak i rozložení (lokaci) Ca²⁺ v buňce. Konkrétně se jedná o vzájemnou interakci mezi 4 základními procesy:

1. vstupem Ca²⁺ do buňky,
2. vyrovnáním koncentrace Ca²⁺,
3. vnitřním ukládáním Ca²⁺,
4. uvolněním Ca²⁺ z buňky.

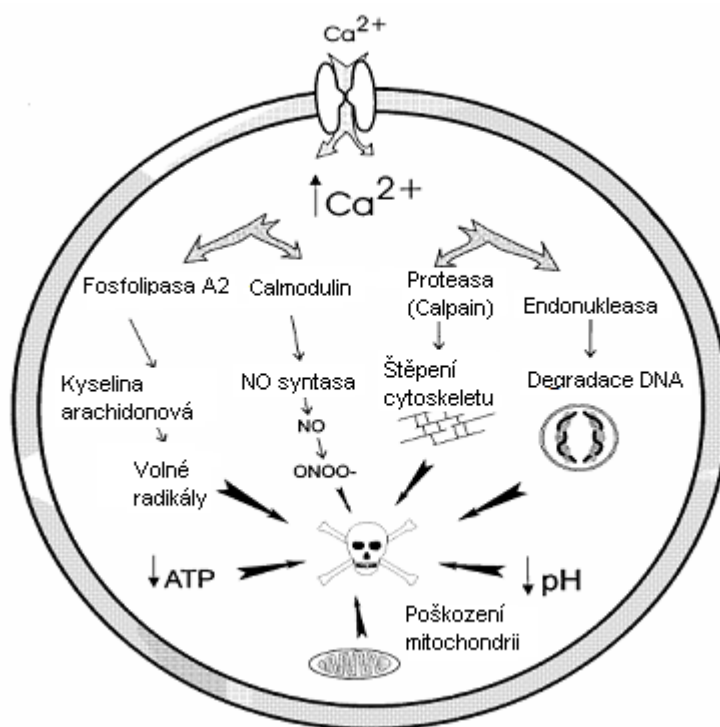
Schéma znázorňující rovnováhu Ca²⁺ iontů v neuronu je na **Obr.6** (str. 11).⁸

V situaci, při které dojde k zvýšení Ca²⁺ iontů v buňce a se kterou se nevypořádá ani výše popsany komplex reakcí na udržení stálé hladiny Ca²⁺ iontů, jsou aktivovány procesy, jež vedou k poškození neuronu nebo ke vzniku toxinů, které způsobí buněčnou smrt. Těchto reakcí se účastní celá řada enzymů – proteasy, lipasy, endonukleasy. Sled možných reakcí, které mohou nastat po zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ iontů, je znázorněn na **Obr. 7** (str. 12).⁸



Obr. 6 Přehled reakcí udržujících rovnovážnou hladinu Ca^{2+}

1. Vstup Ca^{2+} a Na^+ zároveň s výstupem K^+ na iontových kanálech spojených s receptory, např. glutamátových receptorech.
2. Výstup Ca^{2+} iontů z buňky za spotřeby ATP.
3. Vstup Ca^{2+} podmíněný potenciálem na membráně.
4. Ca^{2+} výstup výměnou za Na^+ ionty.
5. Přídavné iontové kanály přispívající k membránové repolarizaci a k iontové homeostázi.
6. Vstřebávání a uvolňování Ca^{2+} iontů endoplasmatickým retikulem.
7. Tok Ca^{2+} iontů přes jadernou membránu s potencujícím efektem na transkripci nukleových kyselin.
8. Uložení Ca^{2+} iontů do mitochondrie.
9. Intracelulární systém vyrovnávající hladinu Ca^{2+} iontů pomocí Ca^{2+} - vazebných proteinů.



Obr. 7 Sled buněčných reakcí reagujících na zvýšenou hladinu Ca^{2+}

NO = oxid dusnatý

ONOO- = peroxonitrit

ATP = adenosintrifosfát

DNA = kyselina deoxyribonukleová

Objasnění polohy a struktury vazebného místa pro neurosteroidy, které ovlivňují glutamátové receptory, a tím i vstup Ca^{2+} iontů do buňky, by mohlo pomoci při návržení a cílené syntéze vhodného ligandu, jenž by byl schopen v případě ohrožení vhodně inhibovat tento receptor a regulovat tok Ca^{2+} iontů do buňky. Tím by bylo možno zabránit ztrátě buněk, které nezahynou bezprostředním nedostatkem kyslíku, ale následně výše popsáním mechanismem – vyloučením glutamátu a následnému toku Ca^{2+} iontů do buňky.

1.6 Afinitní a fotoafinitní značení

Získat informace o struktuře vazebného místa v biomolekule lze například pomocí afinitního značení, které používá deriváty ligandů, jež mají možnost vytvořit kovalentní vazbu ligand-protein. Tato technika byla využita ke značení mnoha vazebných proteinů –

např. hormonových receptorů, enzymů, imunoglobulinů a dalších. Afinitní značení se také používá při studiu membránových struktur.⁹

Podstatou metody afinitního značení je přirozená afinita mezi ligandem (např. hormon, protilátka, substrát) a receptorem (např. enzym, transportní protein).

Při modifikaci chemické struktury jednoho z interagujících partnerů (nejčastěji molekuly ligandu) – zavedením chemicky reaktivní skupiny – vzniká afinitní sonda. Ta by měla po přidání do reakční směsi vytvořit kovalentní vazbu se svým vazebným partnerem. Za předpokladu ideálního vzájemného působení vzniká kovalentní komplex ligand – receptor. Touto metodou lze identifikovat vazebné místo či aktivní centrum na molekule receptoru.¹⁰

Popsaná metoda afinitního značení obsahuje dva podstatné nedostatky:

1. Reaktivita afinitní sondy nesmí být příliš vysoká, aby sonda nepodléhala hydrolytickým reakcím (většina reakcí probíhá ve vodném prostředí), a nedocházelo tak k deaktivaci ještě před požadovaným navázáním.
2. Není možné zamaskovat afinitní sondu takovým způsobem, který by umožňoval reaktivaci za požadovaných podmínek. Do jisté míry je s tímto spojen i problém nespecifického značení, tj. interakce sondy na jiném než specifickém vazebném místě pro ligand, resp. receptor.⁸

Proto byly vypracovány postupy využívající fotoreaktivní deriváty. Hlavní výhodou fotoafinitní sondy proti výše popsané afinitní sondě je fotolytická aktivace chemicky inertní sondy na chemicky reaktivní skupinu v požadovaném čase. Krátký poločas života a značná reaktivita s poměrně nízkou selektivitou aktivované sondy umožňuje kovalentně modifikovat všechny AMK zbytky v blízkosti reaktivního intermediátu. Tímto způsobem je snížena pravděpodobnost nespecifického značení a možnost použití fotoafinitních sond se tak podstatně rozšiřuje ve srovnání s klasickými afinitními sondami. Ideální fotoafinitní sonda by měla splňovat tato kritéria:

1. Vlnová délka pro aktivaci sondy nepoškozuje a nemění vlastnosti biomakromolekuly – ideální je nad 300 nm – fotolabilní skupiny by měly mít i při nízké intenzitě světelného zdroje vysokou schopnost fotolýzy – tj. co největší absorpční maximum při této vlnové délce.
2. Podobnost sondy s původní sloučeninou (ligandem). Zavedení fotolabilní skupiny do molekuly by nemělo ovlivnit její strukturální a funkční vlastnosti.

3. Intermediáty vzniklé fotolýzou se musí vyznačovat vysokou reaktivitou, což souvisí s krátkou dobou života, a nízkou selektivitou – tj. reaktivitou vůči různým funkčním skupinám. Tyto intermediáty nesmí podléhat přesmykům, které by negativně ovlivnily výtěžek, popřípadě by vedly i k reakcím mimo vazebné centrum.
4. Stabilita a chemická inertnost za experimentálních podmínek. Stabilita při změnách pH okolo hodnoty fyziologického pH, odolnost proti oxidačnímu i redukčnímu prostředí.
5. Jednoduchá syntetická dostupnost.
6. Kovalentní vazba mezi ligandem a receptorem by měla být odolná v podmínkách běžných separačních a charakterizačních metod – např. proti činidlům, která štěpí proteiny.¹⁰

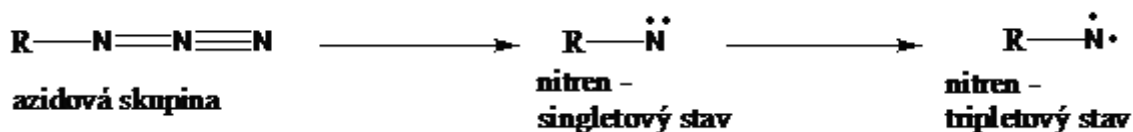
Tato přísná kritéria nelze uplatnit plně na žádnou reálnou molekulu. Při výběru se tak vždy jedná o kompromis, který vyhovuje danému použití.¹⁰

Příklady fotolabilních skupin používaných při syntéze fotoafinitních sond: diazoketony, alkyl-, acyl-, arylazidy, α , β – nenasycené ketony, arylhalidy, nitrosloučeniny.⁹

Účinným nástrojem fotoafinitního značení jsou nitreny. Zatím se však nenašel nitren, který by byl optimální ve všech situacích. Z doposud známých jsou nejpoužívanější arylnitreny. Jejich prekurzorem je téměř vždy azid, který má mnoho výhod. Arylazidy jsou snadno dostupné a způsob, jímž arylazidová skupina atakuje zkoumanou biochemickou strukturu, je znám. Fotochemické chování vhodně substituovaných arylazidů vyhovuje požadavkům. Absorbují světlo vlnové délky od 300 nebo dokonce 400 nm, přičemž extinkční koeficienty jsou dost vysoké na zachycení většiny dopadajícího světla. Z toho vyplývá jednak krátká doba ozáření, jednak ochránění biomolekul proti fotochemickému zničení – vysoká absorpce azidů chrání biomolekuly během krátké doby ozáření.¹¹

Fotolýza azidu probíhá, jak je znázorněno na **Obr. 8** (str. 15), rozpadem azidoskupiny na dvě hlavní formy reaktivního intermediátu. Prvotně vzniká nitren v singletovém stavu, který je obklopen sextetem elektronů, a nepárové elektrony mají antiparalelní spin. Atak elektronového páru je tak pro singletový stav nitrenu charakteristickou reakcí. Druhým intermediátem je nitren v tripletovém stavu – nepárové elektrony tohoto nitrenu mají paralelní spin – chovají se jako biradikál. Charakteristickou

reakcí pro tento stav je vytržení atomu vodíku z atakované skupiny. Tripletový nitren méně podléhá přesmykům a vykazuje nižší selektivitu.¹⁰



Obr. 8 Fotolýza azidové skupiny na nitren

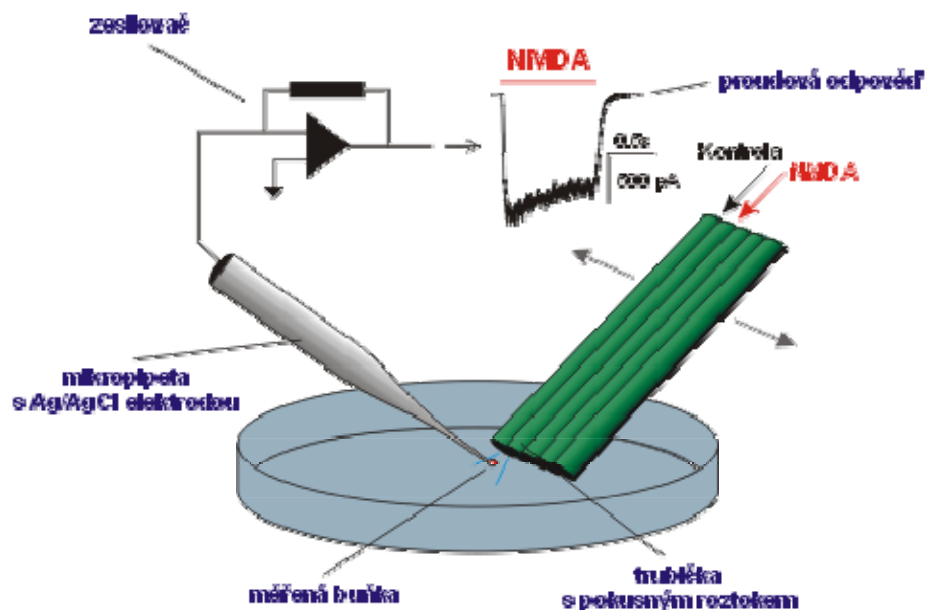
Možnosti i omezení použití nitrenů podmíněné jak vlastnostmi jich samotných, tak jejich prekursorů pro fotoafinitní značení, jsou námětem několika studií.

Nitren a jeho prekursor by měly splňovat následující požadavky, které se shodují s již uvedenými obecnými vlastnostmi fotoafinitních sond:

1. Nitrenový prekursor musí obsahovat takový substituent R, který vykazuje biochemickou aktivitu, takže prekursor se naváže na vazebné místo receptoru.
2. Nitren by se měl tvořit efektivně bez ztrát a bez zničení cílového systému. Výtěžnost vzniklých nitrenů a extinkční koeficient prekursoru by měly být vysoké. Vlnová délka světelného záření potřebného pro aktivaci by měla být tak dlouhá, aby nepoškodila systém.
3. Prekursor by měl být chemicky stabilní, nereagující se systémem a neměl by se rozpadat při použitých teplotách. Velmi důležitou roli hraje hydrolytická stabilita.¹¹

1.7 Metoda terčíkového zámku

Metoda terčíkového zámku (z angl. patch clamp) je elektrofyziologická metoda, která umožňuje měřit velikost napětí na buněčné membráně nebo proud, který přes ni prochází (**Obr. 9**, str 16). U této metody existuje více možností uspořádání experimentu, jejichž přehled je následně uveden v **Tab. 1** (str. 17).¹²



Obr. 9 Schematické znázornění uspořádání „patch clamp“ experimentu využívajícího aplikační systém rychlé výměny roztoků.¹³

1.7.1 Přísátí k buňce

Jedná se o nejjednodušší konfiguraci experimentu „patch clamp“. Každý „patch clamp“ experiment začíná následujícím způsobem: skleněná pipeta se přiblíží k buňce a jemným podtlakem je k této buňce přisáta, čímž vznikne velmi silné spojení (odpor $> 1 \text{ G}\Omega$). Nyní je možno studovat aktivitu iontového kanálu v malém terčíku membrány, který je obklopený špičkou pipety. Jedná se tedy o jednokanálovou konfiguraci. Toto uspořádání nepoškozuje buňku, a proto je nejvhodnější fyziologickou metodou ke studiu jednotlivých kanálů na co nejjednodušší bázi. Bohužel tato metoda nedovoluje manipulaci média na žádné straně membrány. Pipeta na extracelulární straně membrány je obvykle naplněna extracelulárním roztokem.¹²

1.7.2 Snímání z celé buňky

Pokud je v konfiguraci „přísátí k buňce“ membrána v terčíku pod pipetou prudce nasáta, dojde k jejímu protržení a k přímému elektrickému propojení intracelulárního prostoru buňky s elektrodou v pipetě. Uspořádání experimentu je velmi podobné jako v předchozím případě: elektroda je na jedné straně plasmatické membrány a zemnicí elektroda na straně druhé, membránový potenciál potom může být měřen přímo.¹²

Tab. 1 Možnosti uspořádání experimentu „patch clamp“ a jejich výhody a nevýhody¹²

Název metody	Použití	Výhody	Nevýhody
Přísátí k buňce (z angl. Cell-attached patch)	Snímání jednotlivých kanálů z terčíku.	<ul style="list-style-type: none"> • Cytosolická strana zůstává neporušena. • Snadné provedení. 	<ul style="list-style-type: none"> • Přesný potenciál terčíku neznámý. • Nesnadná výměna extracelulárního roztoku.
Snímání z vytrženého terčíku v konfiguraci outside-out. (z angl. Outside-out excised patch)	Snímání jednotlivých kanálů z terčíku.	<ul style="list-style-type: none"> • Rychlá výměna extracelulárního roztoku. • Cytosolární prostředí je kontrolováno. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vymytí cytosolárních faktorů. • Porušení cytoskeletu.
Snímání z vytrženého terčíku v konfiguraci inside-out. (z angl. Inside-out excised patch)	Snímání jednotlivých kanálů z terčíku.	<ul style="list-style-type: none"> • Snadná výměna cytosolárního roztoku. • Extracelulární prostředí je kontrolováno. 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracelulární roztok musí být nahrazen intracelulárním roztokem. • Relativně obtížné. • Porušení cytoskeletu.
Snímání z celé buňky	Snímání z celé buňky	<ul style="list-style-type: none"> • Rychlé proražení skupiny iontových kanálů. • Kontrola cytosolárního prostředí • Rychlá výměna extracelulárního roztoku. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vymytí cytosolárních faktorů.

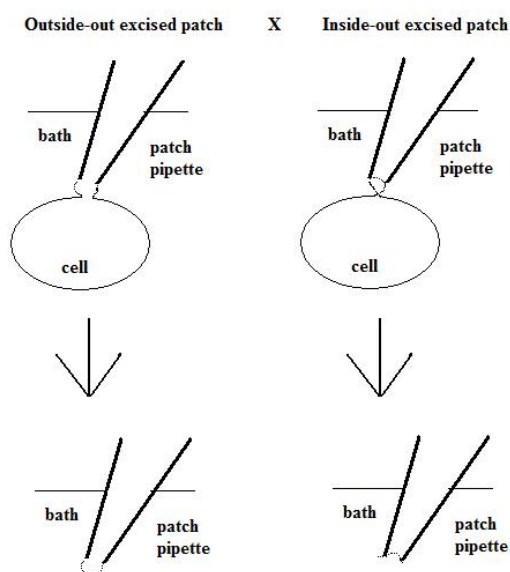
1.7.3 Snímání z vytrženého terčíku v konfiguraci „outside-out“ a „inside-out“

Tyto dvě jednokanálové konfigurace jsou založené na principu odstranění části membrány – terčíku, a studium této části membrány probíhá izolovaně. „Outside“ a „Inside“ se zde vztahují k extracelulární a intracelulární části membrány, respektive „out“ se vztahuje k extracelulárnímu roztoku.

„Outside-out patch“ je jednoduše získatelný z konfigurace Snímání z celé buňky, kdy se pipeta od buňky odtáhne, tím se část buněčné membrány odtrhne a vznikne

membránový terčík orientovaný extracelulární částí vně pipety. Tato metoda se využívá pro studium extracelulárních faktorů na iontové kanály, protože složení vnějšího extracelulárního roztoku může být snadno měněno.

„Inside-out patch“ se získá při odtažení pipety od membrány při cell-attached konfiguraci. Výsledkem je váček přilepený na hrotu pipety. Váček může být zničen expozicí na vzduchu – tj. například při vytažení pipety z extracelulárního roztoku. Inside-out konfigurace je vhodná pro studium vlivu cytosolárních faktorů na iontový kanál. Na **Obr. 10** je znázorněn rozdíl mezi těmito dvěma technikami.¹²



Obr. 10 Rozdíl mezi Outside-out a Inside-out technikou

1.7.4 Snímání z perforovaného terčíku

Jedná se o stejnou konfiguraci jako v případě „přísátí na buňku“, ale navíc jsou do intracelulárního roztoku přidány látky (např. nystatin nebo amphotericin B), které specificky perforují membránu. Vzniklé otvory potom propouští ven pouze částice do určité velikosti.¹²

1.8 Fluorescenční značení

Fluorescenční sondy představují významnou součást fluorescenčně spektroskopických metod. Požadované spektrální vlastnosti fluoroforu - vlnová délka absorpce a emise a časové parametry jsou určeny rozlišovací schopností přístrojů. Fluorescenční sondy se dají rozdělit do dvou základních skupin – vlastní a nevlastní. Vlastní fluorofory jsou převážně přírodní látky: aromatické aminokyseliny, NADH, flaviny

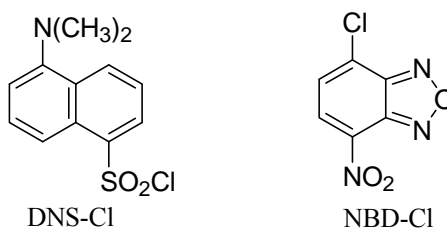
a chlorofyl. Mezi nevlastní řadíme takové substituenty, které se zavádějí do vzorků bez fluorescenčních vlastností, nebo je třeba jejich fluorescenční vlastnosti změnit. Sem patří např. deriváty fluoresceinu, rhodaminu a dansylu.¹⁴

Předkládaná práce se zabývá designem, syntézou a ověřením vlastností nevlastní fluorescenční sondy.

1.8.1 Nevlastní fluorofory

Nevlastní fluorofory můžeme rozdělit podle toho, zda je vazba na studovanou látku kovalentní či nekovalentní.

Prekursory kovalentních značek nesou reaktivní skupinu. Kovalentní značky mohou mít různé reakční skupiny – vhodné pro spojení s amino-, sulfhydrylovou nebo histidinovou skupinou postranního řetězce aminokyselin. Na **Obr. 11** je znázorněn dansyl chlorid (DNS-Cl), který se často používá pro značení proteinů,¹⁴ a NBD-Cl, který byl použit pro přípravu naší fluorescenční sondy.

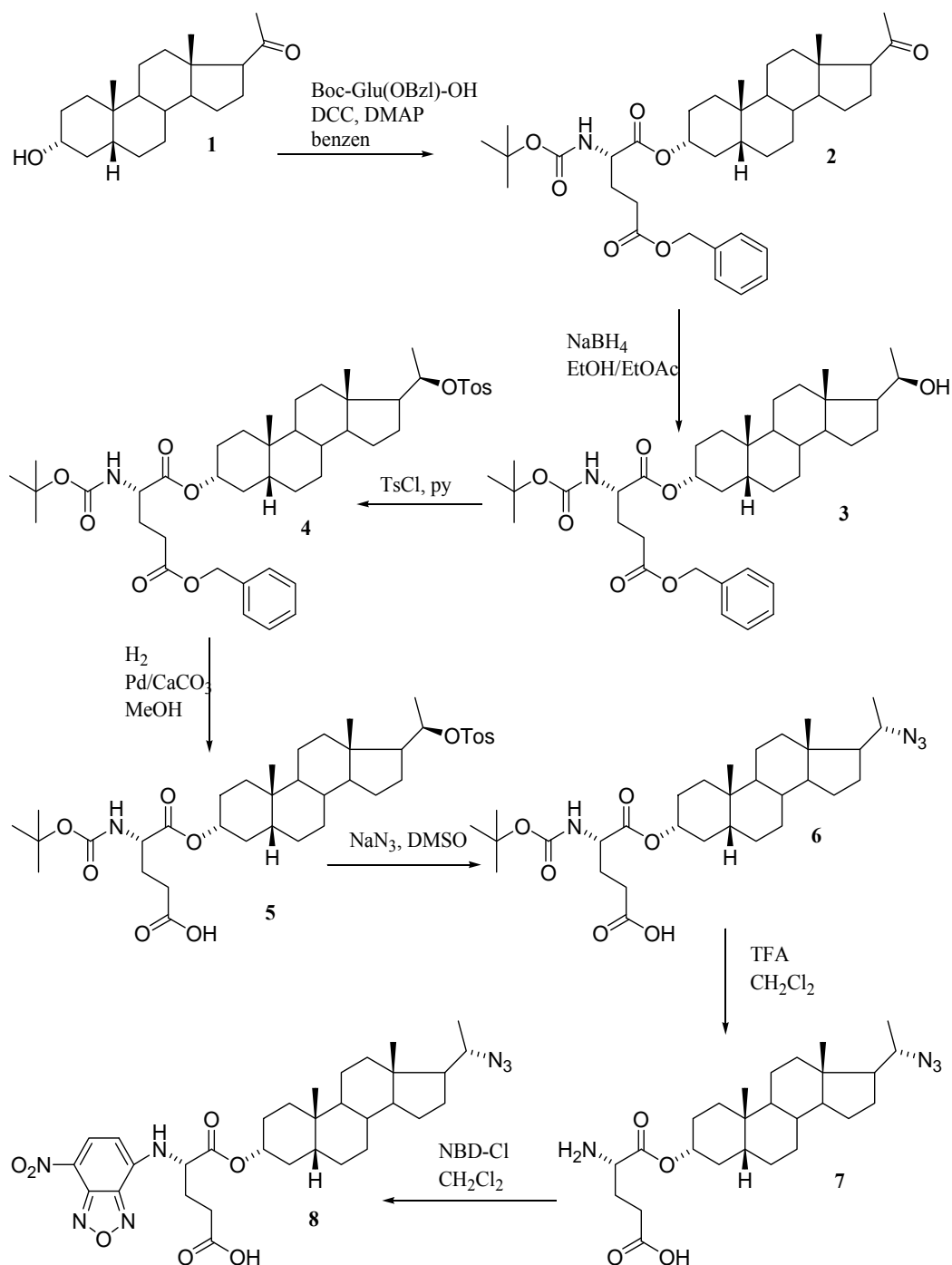


Obr. 11 Příklad kovalentně se vázajících fluoroforů

NBD-Cl je nefluoreskující látka, která se stává fluoreskující až po reakci s alifatickým aminem, případně thiolem. Fluorescenční spektra této látky jsou vysoce citlivá na okolní prostředí. Intenzita fluorescence se výrazně snižuje ve vodných roztocích. NBD-amin adukty mají $\lambda_{\text{ex}} = 464 \text{ nm}$, a $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$ ve vodných roztocích. NBD-Cl se využívá zejména při značení peptidů, bílkovin a jiných biomolekul, a také některých léčiv.¹⁵

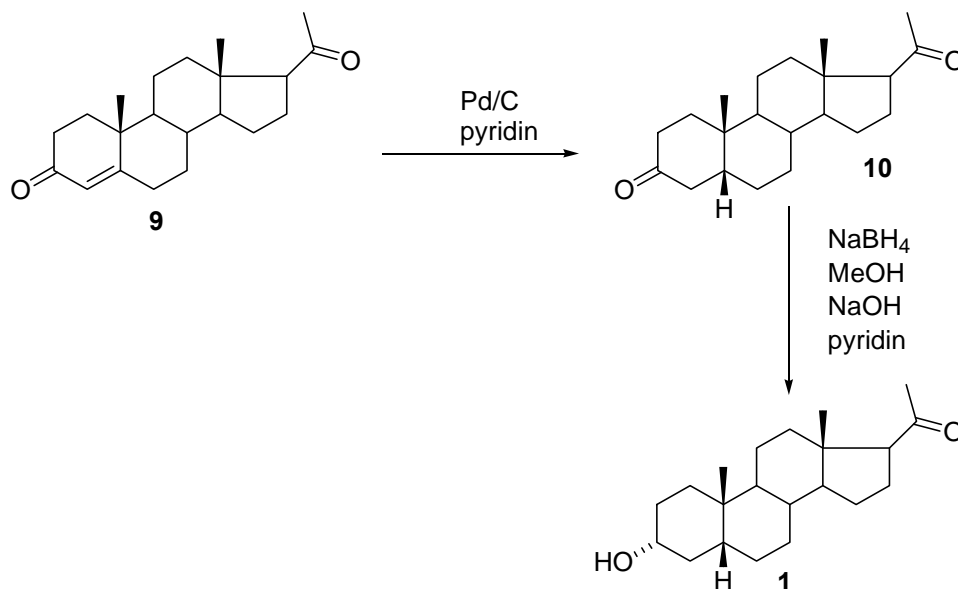
1.9 Úvod do problematiky syntézy

Jedním ze záměrů diplomové práce byla syntéza steroidu s 5 β -pregnanovým skeletem, který by měl jak fotolabilní azidovou skupinu v poloze C-20, tak fluorescenční značku navázanou přes aminoskupinu glutamátu navázaného v poloze C-3 **8** (Obr. 12).



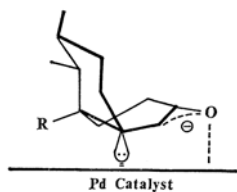
Obr. 12 Syntéza fluorescenčně značeného inhibitoru NMDAR s fotolabilní azidovou skupinou v poloze C-20

Výchozí látkou pro tuto syntézu byl pregnanolon **10** získaný hydrogenací komerčně dostupného progesteronu **9**¹⁶ a následnou redukcí ketoskupiny v poloze C-3 za vzniku alkoholu **1**¹⁷ (**Obr. 13**).

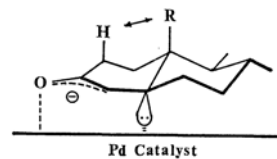


Obr. 13 Příprava pregnanolonu

Hydrogenace progesteronu byla provedena v pyridinu, neboť transitní stav v tomto bazickém rozpouštědle přednostně umožňuje vznik 5β konfigurace (**Obr. 14**), zatímco transitní stav v neutrálním prostředí na **Obr. 15** vede ke vzniku 5α-konfigurace.¹⁶

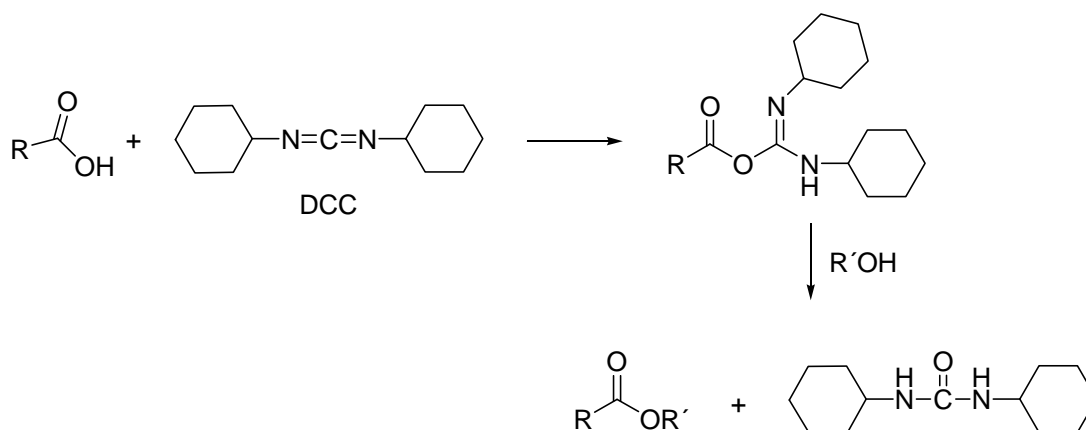


Obr. 14 Transitní stav vedoucí
k 5β konfiguraci



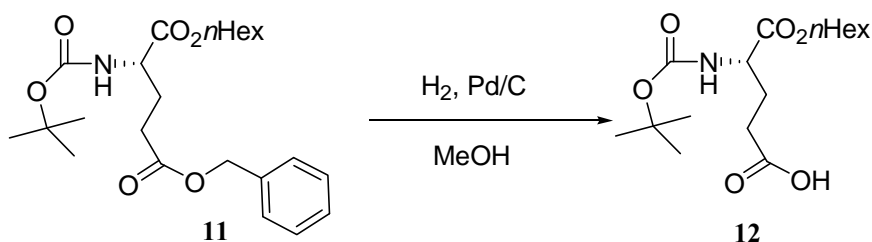
Obr. 15 Transitní stav vedoucí
k 5α konfiguraci

Další reakcí je esterifikace volné hydroxylové skupiny v poloze C-3 kyselinou glutamovou za tvorby α -esteru. Reakce byla plánována s ohledem na spolehlivost a jednoduchost provedení. Proto jsme použili kyselinu glutamovou s chráněnou ω -karboxylovou- i aminoskupinou. Použití DCC jako kondenzačního činidla rovněž splňovalo obě podmínky, navíc reakce probíhá při laboratorní teplotě. Mechanismus esterifikace (**Obr. 16**) spočívá v aktivaci volné karboxylové skupiny adicí na DCC a reakci tohoto komplexu se steroidním alkoholem za vzniku požadovaného esteru a uvolnění N,N'-dicyklohexylmočoviny.¹⁸



Obr. 16 Mechanismus esterifikace s DCC

Další reakcí je selektivní odchránění benzylem chráněného ω -karboxylu glutamátu při zachování chránící aminové skupiny –Boc (**Obr. 17**). Toho bylo dosaženo rozpuštěním chráněného glutamátu v methanolu a hydrogenací v přítomnosti 10% Pd/C.¹⁹



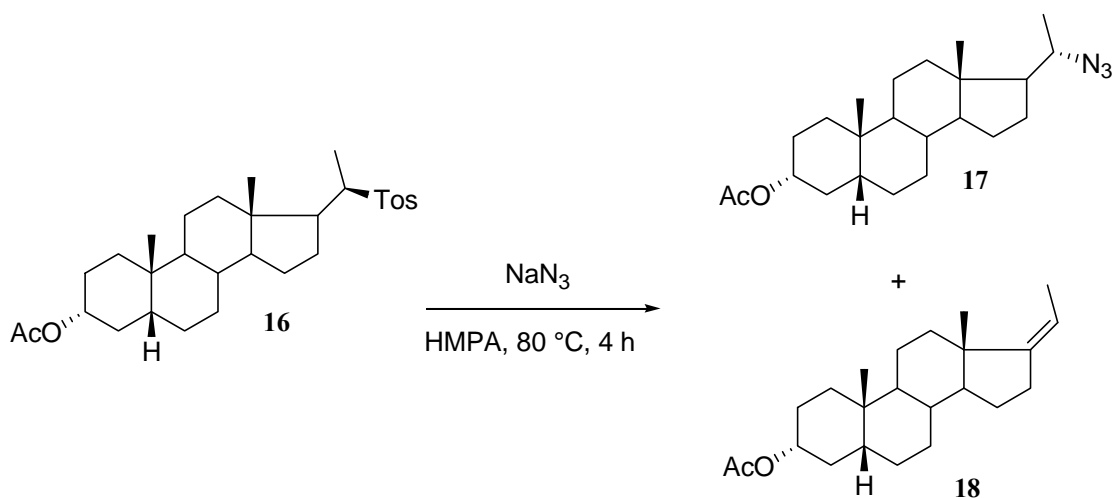
Obr. 17 Schéma 1 Selektivní odchránění karboxylové kyseliny

Azidaci v poloze C-20 bylo možno provést více způsoby. Jedním z nich je Mitsunobova reakce, která nabízí více možností provedení. Jako první jsme vyzkoušeli rozpuštění alkoholu v THF, přidání diethyl-azodikarboxylátu (DEAD) a difenylfosforyl azidu (DPPA) při 0°C. Ukončení reakce nalitím do vody však způsobuje kontaminaci vedlejšími produkty (**Obr. 18**, str. 23).²⁰ Reakční činidla jsou znázorněna na **Obr.19** (str. 23).



Obr. 20 Mitsunobova reakce

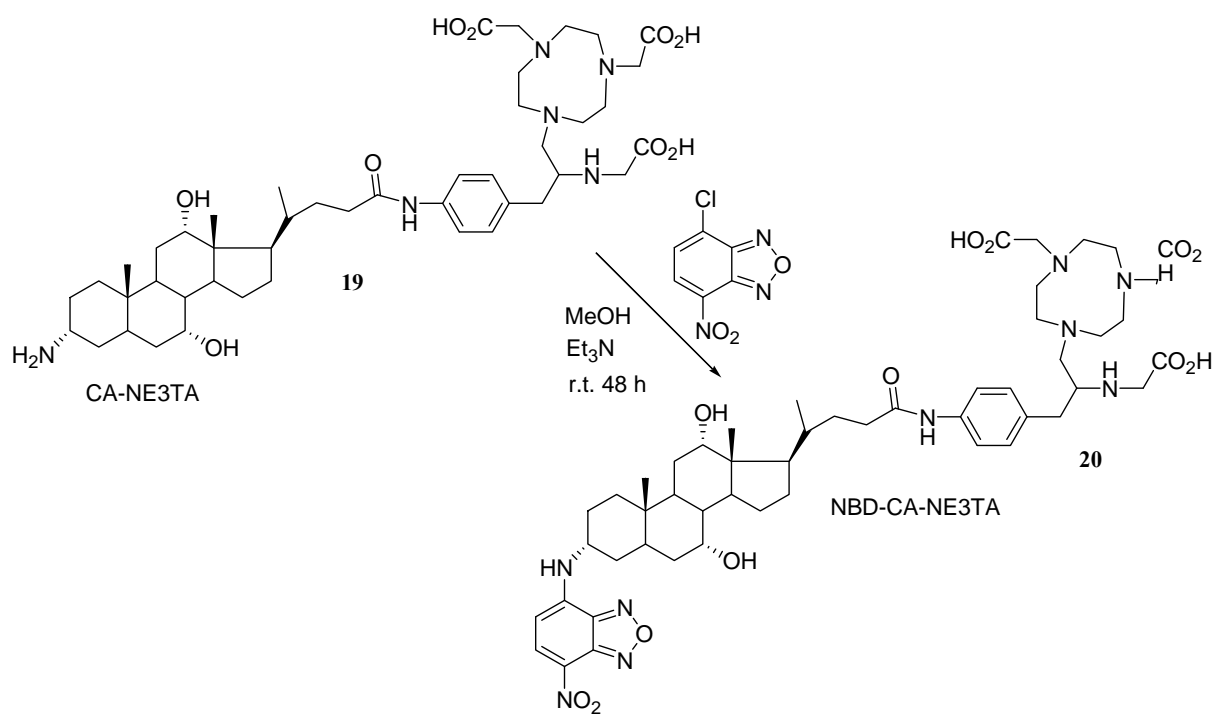
Dalším způsobem azidace v poloze C-20 je nukleofilní substituce S_N2, při které je alkohol aktivován dobře odstupující skupinou, v tomto případě tosylátem. K tosylátu rozpuštěném v hexamethylfosforamidu (HMPA) je přidán azid sodný a reakce probíhá po dobu 4 h při teplotě 80 °C. I při této reakci však vzniká jako vedlejší produkt nenasycený derivát²¹ (**Obr. 21**, str. 24).



Obr. 21 Azidace v poloze C-20 substitucí tosylátu za azidovou skupinu

Pro fluorescenční značení byl vybrán 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (**Obr. 11**, str. 19). Jeho použití v oblasti značení aminokyselin, případně aminokyselinových zbytků, je již známé a jeho fluorescenční vlastnosti jsou vyhovující.²²

Fluorescenční značka NBD-Cl již byla využita např. při syntéze značené steroidní látky, konjugátu žlučové kyseliny a polyaminkarboxylátu - NBD-CA-NE3TA (**Obr. 22**, str. 25), která se uplatňuje při omezení růstu nádorových buněk díky chelatačním vlastnostem NE3TA (polyaminokarboxylátový chelátor), který na sebe váže ionty železa, jež jsou důležité např. pro enzym ribonukleotid reduktázu (katalyzuje přeměnu ribonukleotidu na deoxyribonukleotid).²³



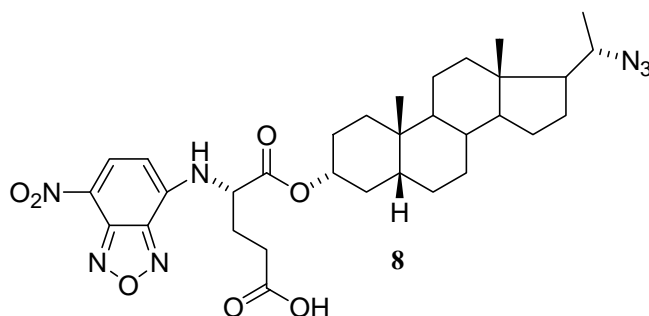
Obr. 22 Fluorescenční značení NBD-Cl

2. Cíle diplomové práce

V této diplomové práci zabývající se přípravou neuroaktivních steroidů pro studium NMDA receptorů byly stanoveny 2 hlavní cíle.

1. Syntéza fluorescenčně značeného ligandu NMDA receptoru s další funkční potenciálně fotoaktivovatelnou skupinou.
2. Ověření schopnosti syntetizovaných sloučenin modulovat NMDA receptor.

První cíl - syntéza fluorescenčně značené steroidní sondy **8**, vhodné pro studium polohy a struktury vazebného místa pro neurosteroidy na NMDA receptoru vychází ze znalosti přirozeného inhibitoru tohoto receptoru, kterým je $3\alpha5\beta$ S. Jako fotolabilní analog využitelný pro fotoafinitní značení byl zvolen 20-azido-derivát. Již dříve bylo zjištěno, že substituce ketonu azidovou funkční skupinou nesnižuje schopnost sloučeniny vázat se a modulovat NMDA receptor.²⁶ Detegovatelnost sondy je zajištěna zavedením fluorescenční značky NBD do pregnanového skeletu (struktura této látky je znázorněna na **Obr. 23**).



Obr. 23 Struktura fluorescenčně značeného pregnanového derivátu s fotoafinitní azidovou sondou

Druhým cílem této práce bylo ověření schopnosti fluorescenčně značeného ligandu modulovat NMDA receptor. Pro úspěšné splnění tohoto cíle bylo třeba si osvojit práci s buňkami a připravit buňky linie HEK293 exprimující NMDA receptory o podjednotkovém složení NR1-1a/NR2B.

3. Materiál a metody

3.1 Syntetická část

Pro změření bodů tání byl použit přístroj Hund-Wetzlar H 600 (Helmut Hund, Německo). Vzorky pro analýzu byly sušeny nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 100 Pa. Optická rotace byla měřena v chloroformu polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders, USA), $[\alpha]_D$ hodnoty jsou uvedeny v $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Infračervená spektra byla měřena v roztocích vzorků v chloroformu pomocí spektrometru Bruker IFS 55, vlnočty jsou udány v cm^{-1} . ^1H NMR spektra byla měřena v FT modu při 24 °C a 400 MHz na spektrometru Bruker AVANCE-400 v deuteriochloroformu, s tetramethylsilanem (TMS) jako vnitřním standardem. Chemické posuny jsou udány v ppm (δ -stupnice), interakční konstanty (J) jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvadruplet, m – multiplet, písmeno b označuje široký signál (broad). Všechna spektra byla interpretována jako spektra prvního řádu. Při zpracování reakčních směsí byl používán vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (5%), případně nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách pokrytých vrstvičkou silikagelu (ICN Biochemicals). Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Fluka (60 μm). K detekci steroidních látek na TLC deskách byl použit sprej 98% kyseliny sírové s následným zahřátím na 300 – 400 °C. Rozpouštědla byla z roztoků odpařována na vakuové odparce (0,25 kPa) při teplotě lázně 40°C. Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii je uvedena vždy u experimentu.

3.1.2 Příprava (20*S*)-20-Azido-5 β -pregnan-3 α -yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-esteru (8)

Následující sloučeniny **17**, **21**, **22**, **7** a **8** byly připraveny podle schématu na **Obr. 25** (str. 41).

(20*S*)-20-Azido-5 β -pregnan-3-yl 3-acetát (17)

Tosylát **16** (1,022 g, 1,98 mmol) byl rozpuštěn v minimálním množství suchého hexamethylfosfotriamidu (HMPA, 4 ml). K roztoku byl za stálého míchání přisypán azid sodný (1,285 g, 29,42 mmol) a reakční směs byla zahřívána na olejové lázni na 50 °C po dobu 2,5 h. Poté byla reakční směs nalita do vody (300 ml) a následně extrahována

ethyl-acetátem (3 x 150 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (2 x 50 ml), sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu ve směsi petrolether/ether (99:1). Byl získán azid **17** (420 mg, 55%): ^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,66 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,32 d, 3 H, $J = 6,5$ (3 x H-21); 2,03 s, 3 H (OAc); 3,30 – 3,23 m, 1 H (H-20); 4,76 – 4,68 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 2103, 2080, 563 (N_3); 1722 (C=O, acetát); 1256, 1027 (C-O, acetát); 1364 (CH_3 , acetát). HR-MS (+ESI) vypočteno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NaN}_3\text{O}_2$ [$\text{M}^+ + \text{Na}$] 410,2783; nalezeno: 410,2778.

(20S)-20-Azido-pregnan-3 α -ol (21)

Acetát **17** (260 mg, 0,671 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (52 ml). K roztoku byl přidán hydroxid sodný rozpuštěný v MeOH (NaOH, 40,3 mg). Roztok byl zahříván dvě hodiny za stálého míchání na vodní lázni při 43 °C. Průběh reakce byl kontrolován TLC v soustavě petrolether/ether (7:3). Po dokončení reakce byla směs nalita do vody (100 ml) a extrahována do ethyl-acetátu (3 x 100 ml), ethyl-acetátové frakce byly spojeny a promyty vodou (100 ml), HCl (5%, 2 x 50 ml), vodou (100 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 50 ml) a nakonec opět vodou (100 ml). Ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku a odparek byl požadovaný alkohol **21** (230,2 mg, 99%). $[\alpha]_{\text{D}} + 51,4$ (c 0,1). ^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,66 s, 3 H (3 x H-18); 0,92 s, 3 H (3 x H-19); 1,31 d, 3 H, $J = 6,5$ (3 x H-21); 3,30 – 3,23 m, 1 H (H-20), 3,67 – 3,59 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3609 (OH, alkohol); 2103, 2082, 563 (N_3 , azid); 1378 (CH_3 , 18, 19); 1031 (C-O). Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}$ (345,52) vypočteno: 73,00 % C, 10,21 % H, nalezeno: 73,10 % C, 10,36 % H.

(20S)-20-Azido-5 β -pregnan-3 α -yl (2'S)-5'-(*tert*-butoxy)-2'-[(*tert*-butyloxy-karbonyl)amino]-5'-oxopentanoát (22)

Ke steroidnímu alkoholu **21** (230 mg, 0,666 mmol) byl přidán chráněný glutamát (Boc-Glu-O-(tBu), 223 mg, 0,732 mmol) a dimethylaminopyridin (8,12 mg, 0,066 mmol). Tato směs byla po dobu 1,5 h sušena pod vakuem na olejové pumpě. Poté byla zavedena argonová atmosféra a směs byla rozpuštěna v suchém benzenu (10 ml). Následně byl ke směsi přikapán 1M roztok N,N'-Dicyclohexylcarbodiimidu v benzenu (1 ml, 0,999 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs přefiltrována přes buničinu a filtrát byl nalit do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (75 ml) a extrahován ethyl-acetátem (3 x 75 ml). Spojené organické fáze byly

promyty vodou (2 x 50 ml). Spojené vodné fáze po promytí byly extrahovány ethylacetátem (2 x 50 ml). Spojené ethyl-acetátové fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Odparek byl požadovaný ester steroidního alkoholu s chráněnou kyselinou glutamovou **22** (288 mg, 69 %): $[\alpha]_D + 40,5$ (c 0,26). ^1H NMR (400 MHz) in CDCl_3 : 0,66 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,32 d, 3 H, $J = 6.5$ (3 x H-21); 1,44 m, 18 H (9 x H-OBoc, 9 x H-*t*Bu); 2,38-2,34 m, 2 H (CH_2 -4'); 3,31-3,24 m, 1 H (H-20); 4,28-4,22 m, 1 H (CH -2'); 4,81-4,73 m, 1 H (H-3); 5,08 d, 1 H, $J = 8.3$ (CH -2'). IČ spektrum: 3437 (NH, amid); 2980 (CH_3 , Boc); 2103, 2080 (N_3 , azid); 1716 ($\text{C}=\text{O}$, karbonyl); 1501 ($-\text{NH}$, amid); 1379 (CH_3 , 18, 19); 562 (N_3 , azid). HR-MS (+ESI) vypočteno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{S} [\text{M}^+ + \text{Na}]$ 653,4249; nalezeno: 653,4257.

(20S)-20-Azido-5 β -pregnan-3 α -yl L-glutamyl 1-ester (7)

Derivát **22** (125 mg, 0,198 mmol) byl rozpuštěn v koncentrované kyselině trifluoroctové (0,64 ml) v ultrazvukové lázni. Po ½ h byla baňka s reakční směsí dána do digestoře a zbytky trifluoroacetátu byly odfoukány. Reakce byla kontrolována TLC ve směsi methanol/chloroform/kyselina octová (10:90:1). Po odfoukání kyseliny trifluoroctové byl odparek promyt benzenem (2 x 2 ml). Poté byl ke směsi přidán pyridin (150 μl) a MeOH (1 ml). Roztok byl pomalu nalit do vody (25 ml) a ponechán přes noc při 5 °C. Bílá sraženina byla odfiltrována a sušena přes noc v termostatu při 37 °C. Byl získán odchráněný steroidní ester kyseliny glutamové **7** (64 mg, 68 %). $[\alpha]_D + 46,4$ (c 0,26). ^1H NMR (400 MHz) in DMSO: 0,63 s, 3 H (3 x H-18); 0,91 s, 3 H (3 x H-19); 1,26 d, 3 H, $J = 6,4$ (3 x H-21); 3,43-3,35 m, 1 H (H-20); 4,02 bs, 1 H (CH -2'); 4,79-4,71 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3376 (NH_2 , amin); 2103, 2085 (N_3 , azid); 1731 ($\text{C}=\text{O}$, ester, kyselina - dimer); Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$ (474,6) vypočteno: 65,79 % C, 8,92 % H, 11,80 % N; nalezeno: 65,24 % C, 8,93 % H, 10,28 % N.

(20S)-20-Azido-5 β -pregnane-3 α -yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-ester (8)

K roztoku esteru **7** (60 mg, 0,126 mmol) v čerstvě destilovaném dichlormethanu (5 ml) byl přidán triethylamin (53 μl , 0,379 mmol) a 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl, 30,6 mg, 0,153 mmol) rozpuštěný v dichlormethanu (0,5 ml). Baňka s reakční směsí byla zabalena do alobalu. Reakční směs byla míchána 30 h při laboratorní teplotě. Reakce byla kontrolována TLC ve methanol/chloroform/kyselina octová (10:90:1). Poté byla reakční

směs nalita do vody (30 ml) a extrahována ethyl-acetátem (3 x 20 ml). Spojené ethyl-acetátové frakce sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Odparek byl čištěn PTLC ve směsi methanol/chloroform (1:9) a kyselina octová (0,1%). Izolovaný produkt byl rozpuštěn v ethanolu a filtrován přes křemelinu. Odpařením rozpouštědla byl získán fluorescenčně značený steroidní glutamát **8** (42 mg, 54 %) ^1H NMR (400 MHz) in CDCl_3 : 0,66 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,26 d, 3 H, $J = 6,5$ (3 x H-21); 3,30-3,23 m, 1 H (H-20); 4,25 m, 1 H (N-H); 4,87-4,78 m, 1 H (H-3); 5,85 d, 1 H, $J = 8,5$ (H-Ar); 8,44 d, 1H, $J = 8,7$ (H-Ar); IČ spektrum: 2103, 2082 (N_3 , azid); 1735 ($\text{C}=\text{O}$, ester, kyselina - monomer); 1624, 1574, 1533, 1450 (kruh, benzofuran); 1316 (NO_2); HR-MS (+ESI) vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{NaN}_7\text{O}_7$ [$\text{M}^+ + \text{Na}$] 660,3116; nalezeno: 660,3118.

Následující sloučeniny **2**, **3** a **23** byly připraveny podle schématu na **Obr. 26**, str. 43.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-(2'S)-5'-(benzyl)-2'-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-5'-oxopentanoát (2**)**

Ke steroidnímu alkoholu **1** (0,9 98 g, 3,134 mmol) byl přidán chráněný glutamát (Boc-Glu-O-(Bzl)-OH, 1,168 g, 3,447 mmol) a dimethylaminopyridin (38 mg, 0,313 mmol). Tato směs byla po dobu 1,5 h sušena pod vakuem na olejové pumpě. Poté byla zavedena argonová atmosféra a směs byla rozpuštěna v suchém benzenu (35 ml). Následně byl ke směsi přikapán 1 M roztok N,N'-dicyclohexylcarbodiimidu v benzenu (4,8 ml, 4,701 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs přefiltrována přes buničinu a filtrát byl nalit do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (50 ml) a extrahován ethyl-acetátem (3 x 75 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (2 x 50 ml). Spojené vodné fáze po promytí byly extrahovány ethyl-acetátem (2 x 50 ml). Spojené ethyl-acetátové fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu v soustavě petrolether/aceton (95%). Byl získán požadovaný ester **2** s chráněným glutamátem (1,39 g, 70%). ^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,44 s, 9H (*t*-Bu-O); 2,12 d, 3 H, $J=6,1$ (3 x H-21); 2,57 – 2,39 m, 2H (2 x H-3'); 4,32 – 4,27 m, 1H (H-1'); 4,81 – 4,73 m, 1 H, (H-3); 5,13 m, 3H, (H-N, 2 x H-4'); 7,37 – 7,26 m, 5H, (5 x H-Ar). IČ spektrum: 3438 w, 1499 s (N-H, amid); 1732 ($\text{C}=\text{O}$, glutamát); 1702 ($-\text{COCH}_3$, $-\text{NHBoc}$); 1232(glutamát); 1166 vs ($-\text{NHBoc}$). Pro

C₃₈H₅₅NO₇ (637,40) vypočteno: 71,55 % C, 8,69 % H; 2,20 % N; nalezeno: 71,85 % C, 8,45 % H; 2,04 % N.

(20*R*)-20-Hydroxy-5β-pregnan-3α-yl (2′*S*)-5′-(benzyl)-2′-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-5′-oxopentanoát (3)

Ke chráněnému steroidnímu glutamátu **2** (0,336 g, 0,527 mmol) rozpuštěnému v absolutním methanolu (17 ml) a vychlazenému na ledové lázni byl za stálého míchání přidán tetrahydridoboritan sodný (40 mg, 1,054 mmol). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC v soustavě petrolether/ether (1 : 1). Reakce byla ukončena nalitím reakční směsi do vody (40 ml) a produkt byl extrahován ethyl-acetátem (2 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (100 ml), 5% HCl (2 x 30 ml), vodou (50 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 30 ml) a nakonec vodou (50 ml) a byly vysušeny filtrací přes bezvodý síran sodný. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a odparek byl chromatografován na sloupci silikagelu ve směsi petrolether/ether (13 : 7). Byl získán požadovaný alkohol **3** (112 mg, 33%). ¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,74 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,14 d, 3 H, J=6,1 (3 x H-21); 1,44 s, 9 H, (9 x H-OBoc); 3,76 – 3,69 m, 1 H (H-20); 4,31 – 4,26 m, 1 H (H-1′); 4,81 – 4,72 m, 1 H, (H-3); 5,13 m, 3 H, (H-N, 2 x H-4′); 7,36 m, 5 H, (5 x H-Ar). IČ spektrum: 3613 (OH, alkohol); 3436 (NH, amid); 1731 (C=O, estery); 1713 (-NHBoc); 1380 (CH₃, 18, 19); 1062 (C-OH, alkohol); HR-MS (+ESI) vypočteno pro C₃₈H₅₇NaNO₇ [M⁺] 639,4135; nalezeno: 640,4208.

17α-Tosyl-17α-methyl-17a-homo-5β-androstan-3α-yl (2′*S*)-5′-(benzyl)-2′-[(*tert*-butyloxykarbonyl)amino]-5′-oxopentanoát (23)

K výchozímu alkoholu **3** (70 mg, 0,109 mmol) rozpuštěnému v absolutním pyridinu (3 ml) byl za stálého míchání v ledové lázni postupně přisypán *p*-toluensulfonylchlorid (47 mg, 0,218 mmol). Směs byla ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Kontrola reakce byla provedena TLC v soustavě petrolether/ether (1 : 1). K reakční směsi chlazené v ledové lázni byl přidán další *p*-toluensulfonylchlorid (130 mg, 0,602 mmol). Směs byla ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs nalita do vody (5 ml) a extrahována chloroformem (3 x 5 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (2 x 10 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml) a vodou (10 ml) a sušeny filtrací přes bezvodý síran sodný. Chloroform byl odpařen za sníženého tlaku a odparek byl dělen na PTLC v soustavě petrolether/ether (1:1). Bylo získáno 45mg (52 %)

přesmyknutého D-homo derivátu **23**. ^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,80 s, 3 H (3 x H-18); 0,81 d, 3 H (3 x H-21); 0,87 s, 3 H (3 x H-19); 1,45 s, 9 H, (9 x H-OBoc); 2,43 s, 3 H, (Ar- CH_3); 4,16 d, 1 H, $J=10,7$ (H-17a); 4,32 – 4,27 m, 1 H (H-2'); 4,80 – 4,72 m, 1 H (H-3); 5,14-5,11m, 3 H, (H-N, 2 x H-Bn); 7,30 d, 2 H, $J = 8,0$ (H-3-Ar, H-5-Ar); (7,36 m, 5H, (5 x H-Ar')). 7,78 d, 2 H, $J = 8,3$ (H-2-Ar, H-6-Ar).

3.1.2 Příprava 17 α -Azido-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfát pyridiniové soli (**29**)

Sloučeniny **27**, **28** a **29** byly připraveny podle schématu znázorněného na Obr. 28, str. 45.

3 α -Hydroxy-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstan-17 α -yl 17 α -Tosylát (**27**)

Tosylát **16** (500 mg, 0,967 mmol) byl rozpuštěn ve směsi HCl (37%, 4,3 ml) a acetonu (45,7 ml). Roztok byl míchán po dobu 48 h při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (25 ml). Směs byla extrahována ethyl-acetátem (3 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (50 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (50 ml) a vodou (50 ml), byly sušeny bezvodým síranem sodným a ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl dělen na sloupci silikagelu v soustavě petrolether/ether (6:4). Byl získán D-homo tosylát **27** (300 mg, 65%). $[\alpha]_D + 24$ (c 0,26). ^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,80 s, 3 H (3 x H-18); 0,86 s, 3 H (3 x H-19); 2,43 s, 3 H, (Ar- CH_3); 3,66 – 3,58 m, 1 H (H-3); 4,15 d, 1 H, $J=10,7$ (H-17a); 7,30 d, 2 H, $J = 8,1$ (H-3-Ar, H-5-Ar); 7,78 d, 2 H, $J = 8,3$ (H-2-Ar, H-6-Ar). IČ spektrum: 3609, 3548, 3450 (O-H, alkohol); 1454 (CH_3 , tosylát); 1385 (CH_3 , 18, 19); 1174 (SO_2 , tosylát); 1033 (C-OH, alkohol). HR-MS (+ESI) vypočteno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}^+ + \text{Na}$] 497,2702; nalezeno: 497,2693.

17 α -Azido-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstan-3 α -ol (**28**)

Tosylát **27** (250 mg, 0,527 mmol) rozpuštěný v absolutním DMSO (25 ml) byl zahřán na olejové lázni na 95 °C. Poté byl k roztoku přidán azid sodný (1,06 g, 16,3 mmol) a reakční směs byla míchána po dobu 6 h. Potom byla směs nalita do vody (55 ml) a byla ponechána stát přes noc při laboratorní teplotě. Bílá sraženina byla odfiltrována a sušena v termostatu při 40 °C. Poté byla přečištěna PTLC ve směsi petrolether/ether (1:1) a byl získán D-homo azid **28** (90 mg, 49 %). ^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,87 s, 3 H (3 x H-19); 0,89 s, 3 H (3 x H-18); 0,99 d, 3 H, $J=6,7$ (3 x H-17a CH_3); 2,94 s, 1 H (H-17a); 3,66 – 3,59 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3609, (O-H, alkohol); 2102 ($-\text{N}_3$, azid); 1382 (CH_3 , 18,19); 1034 (C-OH,

alkohol). Pro $C_{21}H_{35}N_3O$ (345,5) vypočteno: 73,00 % C, 10,21 % H, 12,16 % N, nalezeno: 71,70 % C, 9,95 % H, 8,99 % N.

17 α -Azido-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstan-3 α -yl 3-sulfát pyridiniová sůl (29)

D-homo azid **28** (80 mg, 0,232 mmol) byl vysušen na olejové vakuové pumpě. Takto vysušený D-homo azid byl pod argonovou atmosférou rozpuštěn v čerstvě destilovaném chloroformu (1 ml). K tomuto roztoku byl rychle přidán oxid sírový pyridin komplex (184 mg, 1.16 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Poté byla směs ponechána 30 min při -20 °C aby se vysrážel zbytek pyridinium sulfátu, který byl ihned odfiltrován. Chloroformový filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a byla získána pyridiniová sůl roidního sulfátu **29** (70 mg, 60%) $[\alpha]_D + 44,9$ (c 0,16). 1H NMR (400 MHz) v $CDCl_3$: 0,86 s, 3 H (3 x H-19); 0,88 s, 3 H (3 x H-18); 0,98 d, 3 H, $J = 6,7$ (3 x H-17aCH₃); 2,93 d, 1 H, $J=1,7$ (H-17a); 4,52-4,44 m, 1 H (H-3); 8,01-7,97 m, 2 H (H-3 a H-5, pyridin); 8,47 tt, 1 H, $J_1 = 7,9$, $J_2 = 1,5$ (H-4, pyridin); 8,98 – 8,96 m, 2 H (H-2, H-6, pyridin). IČ spektrum: 2102 (N₃, azid); 1382 (CH₃, 18, 19); 1049 (SO₃⁻, sulfát). HR-MS (-ESI) vypočteno pro $C_{21}H_{35}N_3O_4S$ [M^+] 425,2348; nalezeno: 424,2276.

3.2 Elektrofyziologická část

3.2.1 Složení roztoků

Pokud není uvedeno jinak, byly všechny chemikálie a roztoky zakoupeny u firmy Sigma.

Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda přečištěná přístrojem Simplicity 185 (Millipore), který funguje na principu membránové filtrace.

- LB médium: 10 g pepton (Serva), 5 g kvasničný extrakt (Serva), 10 g NaCl, 1 l H₂O; sterilizováno v autoklávu po dobu 20 min při teplotě 115 °C, po vychladnutí příp. přidán ampicilin (Krka) 100 µl/ml
- Agarové plotny: 40 g živný agar (Krka)/ 1 l LB média, sterilizováno v autoklávu po dobu 20 min při teplotě 115 °C, po ochlazení na cca 50 °C přidán ampicilin a roztok nalit na Petriho misky
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM K₂HPO₄; pH 7,3
- Versenův roztok s trypsinem: 0,2% trypsin, 10 mg EDTA v 50 ml PBS; pH 7,3
- Kultivační médium pro HEK buňky: 5% fetální telecí sérum (FCS) v médiu Opti-MEM[®] I (Invitrogen)
- Kultivační médium pro transfekované HEK buňky: 6 ml Opti-MEM[®] I (Invitrogen), 600 µl roztoku 10 mM D,L-APV + 30 mM kyselina kynurenová, 60 µl FCS, 120 µl 1 mM MgCl₂, 24 µl roztoku ketaminu (Narketan 10 (Vétoquinol), ředěno 1:1 s vodou)
- Promývací extracelulární roztok: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glukosa, 2 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ (pH 7,3 upraveno NaOH)
- Aplikační extracelulární roztok: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glukosa, 0,2 mM EDTA, 0,7 mM CaCl₂, (pH 7,3 upraveno NaOH)

3.2.2 Použité geny

1. NR1-1a podjednotka (GenBank accesion no. UO8261) v pcDNA I/AMP vektoru (Invitrogen).²⁴
2. NR2B podjednotka (GenBank accesion no. M91562)²⁵ v RK 7 vektoru.

3. Zelený fluorescenční protein eGFP) v pQBI 25 vektoru od firmy Takara (Otsu, Japonsko).

3.2.3 Příprava plazmidové DNA

3.2.3.1 Transformace kompetentních buněk

45 µl kompetentních buněk (XL10-Gold[®]) bylo odpipetováno do vychlazených plastových mikrozkušavek. K nim byly přidány 2 µl směsi β-merkapt ethanolu (vše je součástí QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit (La Jolla, USA)). Obsah zkumavky byl inkubován na ledu po dobu 10 minut a každé 2 minuty byl promíchán. K této směsi bylo přidáno 2-10 µl roztoku DNA (dle odhadované koncentrace). Obsah zkumavky byl jemně promíchán a inkubován na ledu po dobu 30 minut. Následně byl proveden teplotní šok při teplotě 42 °C po dobu 30 s a poté byl znovu inkubován na ledu (2 min). Po přidání 0,5 ml LB média předeřátého na 42 °C byly kompetentní buňky kultivovány po dobu 1 hod v třepačce při teplotě 37 °C. Pak byly buňky nasazeny na agarové plotny s ampicilinem (max. 200 µl buněčné kultury na 1 misku), které byly ponechány v termostatu přes noc (14 – 18 hod) při teplotě 37 °C. Izolované kolonie byly použity pro namnožení bakterií a následnou izolaci plasmidové DNA.

3.2.3.2 Izolace plasmidu pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit

Bakterie byly zaočkovány do 5 ml LB média s ampicilinem a následně byly kultivovány po dobu 12-16 hod v třepačce při teplotě 37 °C. Poté byly bakterie ve zkumavkách centrifugovány po dobu 10 min při 8 000 g při 4 °C (2 zkumavky obsahovaly bakterie s plasmidem nesoucí gen pro NR1-1a podjednotku, 2 zkumavky obsahovaly plasmid s genem pro NR2B podjednotku a 2 zkumavky obsahovaly plasmid s genem pro zelený fluorescenční protein (eGFP)). Poté byl odstraněn supernatant. Peleta byla resuspendována v 250 µl pufru P1 a obsah zkumavky byl přenesen do mikrozkušavky. Dále bylo přidáno 250 µl Pufru P2 a tato směs byla promíchána jemným převrácením (6x). Po přidání 350 µl Pufru N3 byla směs ihned opět jemně promíchána a následně centrifugována po dobu 10 min při 13 000 rpm. Supernatant byl pipetou přenesen na kolonku dodávanou s Kitem a centrifugován po dobu 1 min na stolní centrifuze. Plasmid byl promyt 0,75 ml Pufru PE a opět centrifugován po dobu 1 min. Nakonec byla kolona s plasmidem umístěna do čisté mikrocentrifugační zkumavky. K eluci DNA bylo použito 40

μl sterilní vody zahřáté na 70 °C, bylo ponecháno stát 1 min a poté centrifugováno 1 min. Koncentrace získaného roztoku DNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop.

3.2.4 Magnetická transfekce HEK buněk

0,9 μg DNA (NR1, NR2B a GFP po 0,3 μg) a 0,9 μl transfekčního činidla Matra-A bylo smícháno s 50 μl Opti-MEM[®] I v mikrozkuhavce a inkubováno 20 min při pokojové teplotě. Pak byl obsah mikrozkuhavky přidán ke konfluentním HEK buňkám na 24 jamkové destičce, která byla umístěna na silný magnet a inkubována 15 min při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Poté byly buňky rozpasázovány na 4 Petriho misky (průměr 35 mm), do nichž bylo předem vloženo kulaté krycí sklíčko s naneseným kolagenem a poly-L-lysinem - médium bylo odsáto, buňky byly opláchnuty PBS a pomocí 200 μl Versenova roztoku s trypsinem byly uvolněny z povrchu misky. Následně byly buňky resuspendovány v kultivačním médiu pro HEK buňky po transfekci (s inhibitory NMDA receptorů).

3.2.5 Snímání proudových odpovědí

3.2.5.1 Optická zařízení

Na stolku mikroskopu (Olympus CKX 41) byla umístěna kultivační miska s transfekovanými HEK293 buňkami v promývacím roztoku. Použité zvětšení mikroskopu pro přímou zrakovou kontrolu bylo 200- a 400- násobné. Mikroskop, aplikační zařízení a část snímacího zařízení byly umístěny ve Faradayově kleci na speciálním vzduchovém stole proti vibracím.

3.2.5.2 Aplikace roztoků

Aplikace roztoků na vzorky byla realizována pomocí sestavy deseti paralelně seřazených silikátových trubiček, jejichž vnitřní průměr byl 300 μm a tloušťka stěny 50 μm. Aplikace daného roztoku (tedy laterální posuv) byla zajištěna mikroprocesorem řízeným krokovým motorkem, který zároveň ovládal i otevírání solenoidových ventilů, přes něž byly teflonovými hadičkami samospádem přiváděny roztoky ze zásobních nádob. Vzdálenost ústí trubiček a měřené buňky byla nastavena přibližně na 20 μm. U takto popsaného aplikačního systému se čas výměny roztoků na povrchu buňky pohybuje kolem 10 ms.

3.2.6 Snímání a úprava proudových odpovědí

Pomocí techniky terčíkového zámku s použitím zesilovače Axopatch-200B byly měřeny proudové odpovědi NMDA receptorů, které byly vyvolané rychlou aplikací agonisty. Tato měření byla prováděna při konstantním napětí -60 mV (tzv. voltage clamp). Byla využita technika snímání z celé buňky. Hodnota sériového odporu zpravidla nepřesáhla 10 MΩ a byla kompenzována z 80-90%. U buněk, jejichž kapacita byla <30 pF a hodnota sériového odporu <10 MΩ, byla provedena analýza odpovědí. Pokusy byly prováděny při pokojové teplotě (23 – 26 °C).

Proudové odpovědi byly snímány pomocí skleněných mikropipet, jež bylo nutné připravit vždy před prováděným pokusem. Mikropipety byly vyráběny ze skleněných trubiček z borosilikátového skla o vnějším průměru 1,6 mm a vnitřním průměru 1,2 mm na horizontálním tahači P-97, Sutter Instruments ve 4 krocích. Pro měření technikou snímání z celé buňky byly použity pipety, jejichž odpor při naplnění intracelulárním roztokem byl v rozmezí 3-6 MΩ.

Pomocí mikromanipulátoru (MP 225, Sutter Instruments) bylo možné dosáhnout velice jemné manipulace s mikropipetou. Elektrické spojení mezi intracelulárním roztokem v mikropipetě a zesilovačem bylo umožněno Ag/AgCl elektrodou. Argentchloridová elektroda byla použita i jako elektroda zemnicí, jež byla umístěna v komůrce s extracelulárním roztokem, který byl propojen s roztokem ve snímací misce pomocí solného můstku.

3.2.7 Zpracování naměřených dat

Proudové odpovědi NMDA receptorů byly zpracovány v počítačovém programu Clampfit, jenž je součástí pClamp verze 10.2.

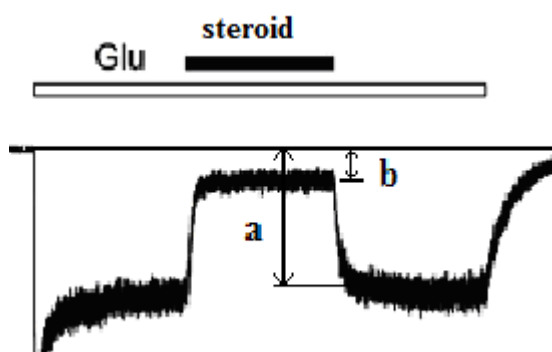
Při analýze inhibičního účinku steroidní látky byla spočítána IC₅₀ z rovnice:

$$\text{relativní inhibice} = I = (1 - b/a) * 100\%$$

$$\text{relativní odpověď} = 1 - I$$

$$1 - I = 1 / (1 + ([\text{steroid}] / IC_{50})^h),$$

přičemž relativní odpověď byla získána z poklesu proudové odpovědi po aplikaci steroidu (**Obr. 24**, str. 38), a kde h je Hillův koeficient.



Obr. 24 Stanovení inhibičního účinku neurosteroidů. Míra inhibice byla spočítána z hodnot vyznačených na obrázku šipkami: relativní inhibice = $(1 - b/a) * 100\%$.

3.3 Elektrofyzilogická měření

3.3.1 Snímání proudové odpovědi při inhibici steroidem **8**

Byly připraveny 4 zásobní roztoky o objemu 10 ml, jejichž složení je uvedené v **Tab. 2**

Tab. 2 Složení zásobních roztoků pro aplikaci na buňku

Roztok 1	Roztok 2	Roztok 3	Roztok 4
Promývací extracelulární roztok	Aplikační extracelulární roztok	Aplikační extracelulární roztok	Aplikační extracelulární roztok
25 µl DMSO	10 µM glycín	10 µM glycín	10 µM glycín
	25 µl DMSO	25 µl DMSO	steroid 8 v 25 µl DMSO, 50 µM
		1 mM kyselina glutamová	1 mM kyselina glutamová

Aplikace těchto roztoků probíhala v následujícím pořadí v předem nastavených časových intervalech, doba výměny aplikace roztoku trvala ~10 ms.

1. Aplikace roztoku 1, 3 sec
2. Aplikace roztoku 2, 3 sec
3. Aplikace roztoku 3, 7 sec
4. Aplikace roztoku 4, 7 sec
5. Aplikace roztoku 3, 9 sec
6. Aplikace roztoku 2, 5 sec
7. Aplikace roztoku 1, 60 sec

Data z měření byla zaznamenána pomocí počítačového programu Clampex 10.2. Výsledkem byl graf z každého měření, jenž byl pak vyhodnocen v programu Clampfit.

Inhibice steroidním derivátem (20S)-20-azido-5β-pregnan-3α-yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-esterem (**8**) byla měřena na 5 buňkách, na každé buňce 8-10x. Z každé série měření byl vybrán 1 graf, který byl dále zpracován.

3.3.2 Snímání proudové odpovědi při inhibici steroidem 29

Byly připraveny 4 zásobní roztoky o objemu 10 ml, jejichž složení je uvedené v **Tab. 3**.

Tab. 3 Složení zásobních roztoků pro aplikaci na buňku

Roztok 1	Roztok 2	Roztok 3	Roztok 4
Promývací extracelulární roztok	Aplikační extracelulární roztok	Aplikační extracelulární roztok	Aplikační extracelulární roztok
25 µl DMSO	10 µM glycin	10 µM glycin	10 µM glycin
	25 µl DMSO	25 µl DMSO	steroid 29 v 25 µl DMSO, 10 µM
		1 mM kyselina glutamová	1 mM kyselina glutamová

Aplikace těchto roztoků probíhala v následujícím pořadí v předem nastavených časových intervalech, doba výměny aplikace roztoku trvala ~10 ms.

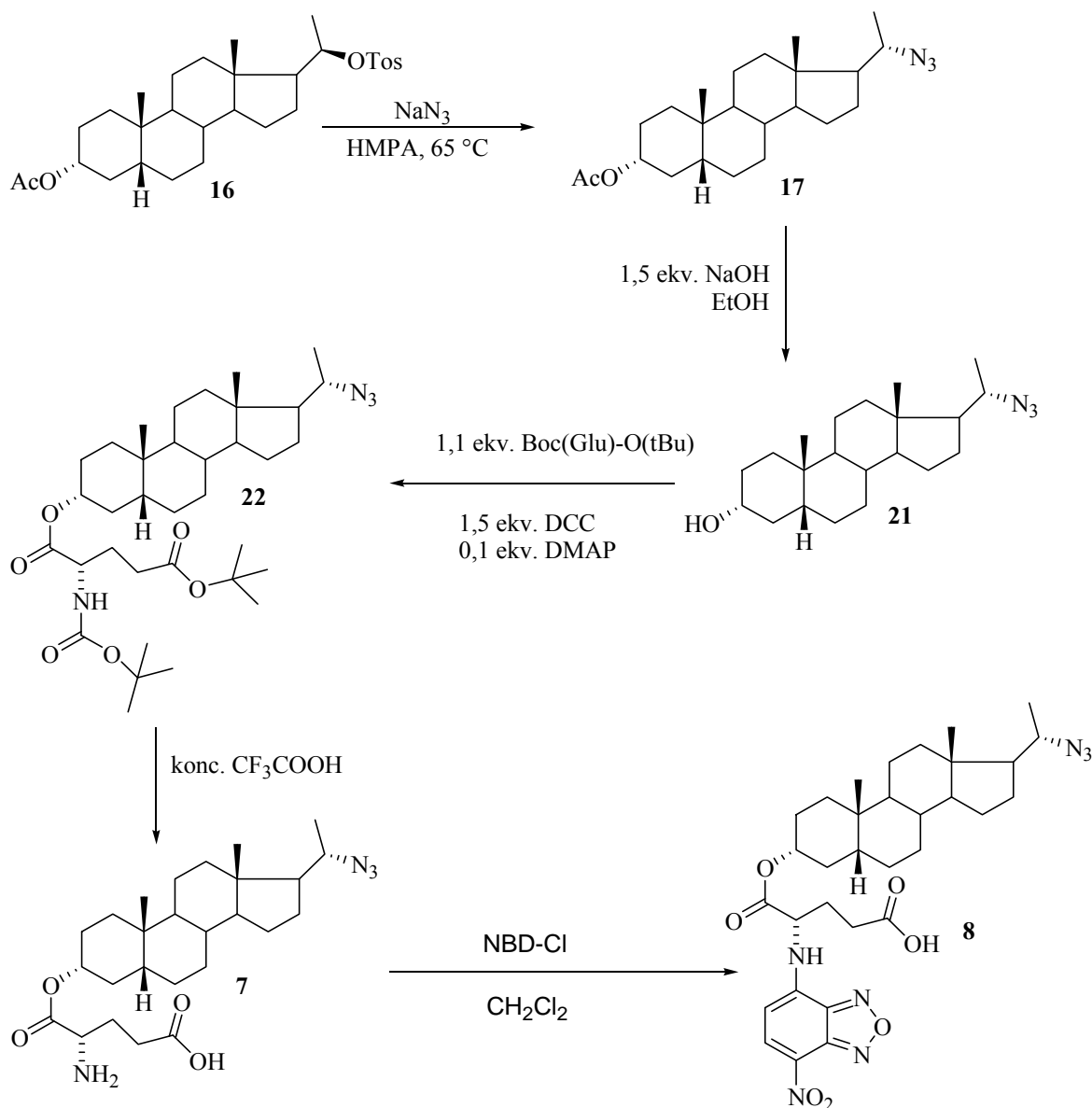
1. Aplikace roztoku 1, 3 sec
2. Aplikace roztoku 2, 3 sec
3. Aplikace roztoku 3, 7 sec
4. Aplikace roztoku 4, 7 sec
5. Aplikace roztoku 3, 9 sec
6. Aplikace roztoku 2, 5 sec
7. Aplikace roztoku 1, 60 sec

Data z měření byla zaznamenána pomocí počítačového programu Clampex 10.2. Výsledkem byl graf z každého měření, jenž byl pak vyhodnocen v programu Clampfit. Inhibice steroidním derivátem 17 α -azido-17 α -methyl-17 α -homo-5 β -androstano-3 α -yl 3-sulfát pyridiniovou solí (**29**) byla měřena na 5 buňkách, na každé buňce 8-10x. Z každé série měření byl vybrán 1 graf, který byl dále zpracován.

4. Výsledky

4.1 Syntetická část

Podařilo se připravit fluorescenčně značený ligand NMDA receptoru **8**, a to podle schématu znázorněného na **Obr. 25**.



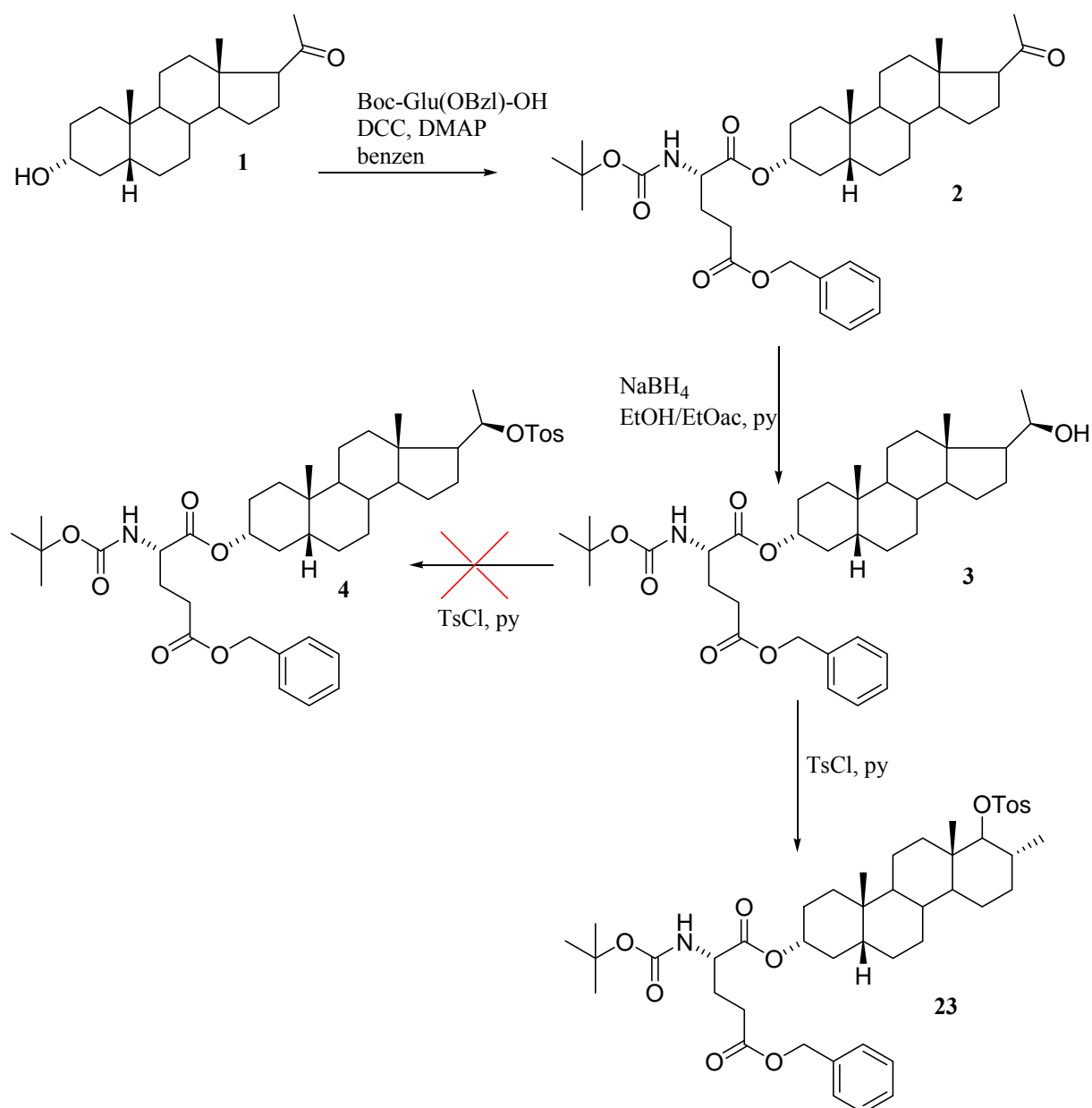
Obr. 25 Syntéza fluorescenčně značeného ligandu NMDA receptoru

Tosylát **16** reagoval s azidem sodným za vzniku steroidního azidu **17**, a to s výtěžkem 55 %. Tato látka byla identifikována ^1H NMR, ve kterém již nebyly pozorovány signály aromatických vodíků ani methylové skupiny charakteristické pro tosylát. V IČ spektru byl pozorován silný charakteristický pás pro azidovou skupinu –

2103 a 2080 cm^{-1} . Acetátová skupina v poloze C-3 u steroidního azidu **17** byla v dalším kroku hydrolyzována a byl obnoven alkohol **21** ve výtěžku 99 %. Tato reakce již byla popsána v bakalářské práci.²⁶ Po této reakci následovala esterifikace alkoholu **21** kyselinou glutamovou s aminoskupinou chráněnou *tert*-butylkarbamátem a ω -karboxylovou skupinou chráněnou *tert*-butylovou skupinou. Vznikl steroid s navázanou ochráněnou kyselinou glutamovou **22** s výtěžkem 69 %. Vodíkové signály pro metyly (1,44 m, 18 H (9 x H-OBoc, 9 x H-*t*Bu)) potvrdily navázání chráněné kyseliny glutamové a v IČ spektru bylo možno pozorovat pás pro vazbu N-H (3437 cm^{-1}) a pro C=O (1716 cm^{-1}). Další reakcí bylo jednokrokové odchránění kyseliny glutamové koncentrovanou kyselinou trifluoroctovou za vzniku látky **7** ve výtěžku 68 %. Obnovení karboxylové i aminové skupiny bylo opět možné potvrdit vodíkovými signály v ^1H NMR. Nebyly pozorovány metylové vodíky chránících skupin. Finálním krokem byla reakce volné aminové skupiny na kyselině glutamové s NBD-Cl, jejímž produktem (výtěžek reakce 54 %) byl fluorescenčně značený steroidní ester kyseliny glutamové s azidovou skupinou na steroidním skeletu v poloze C-20 **8**. Dva dublety aromatických vodíků potvrdily navázání fluorescenční skupiny (5,85 d, 1 H, $J = 8,5$ (H-Ar); 8,44 d, 1H, $J = 8,7$ (H-Ar)), stejně tak jako signály v IČ charakteristické pro benzofuranový kruh.

Při syntéze požadované fluorescenční sondy **8** podle schématu na **Obr. 12** (str. 20) byl dle původně navrženého postupu připraven steroidní glutamát **2**, a to esterifikací 3 α ,5 β -pregnanolonu **1** a kyseliny glutamové s chráněnou ω -karboxylovou- i aminoskupinou, ve výtěžku 70 %. Ten bylo možné prokázat v ^1H NMR spektru vodíkovými signály pro metyly chránící Boc skupiny (1,44 s, 9H (*t*-Bu-O)), dále charakteristickými signály aromatických vodíků benzyly (7,37 – 7,26 m, 5H, (5 x H-Ar)). V IČ spektru se objevil velmi silný pás pro –NHBoc (1166 cm^{-1}). Následná redukce 20-oxo skupiny poskytla alkohol **3** ve výtěžku 33 %. Alkohol byl snadno identifikován signálem charakteristickým pro H-21, který byl rozštěpen na dublet (1,14 d, 3 H, $J=6,1$ (3 x H-21)) a objevil se signál pro H-20 (1 H (H-20) 4,31 – 4,26 m). Vodíkové signály pro chránící skupiny kyseliny glutamové zůstaly beze změny. Také charakteristický pás v infračerveném spektru pro alkohol potvrdil přítomnost hydroxylové skupiny (3613 cm^{-1}). Při tosylaci 20-hydroxylové skupiny však docházelo k přesmyku za vzniku šestičlenného kruhu D v derivátu **23** (výtěžek 52 %), což se podařilo prokázat právě ^1H NMR. Singlet pro tosylátový metyl

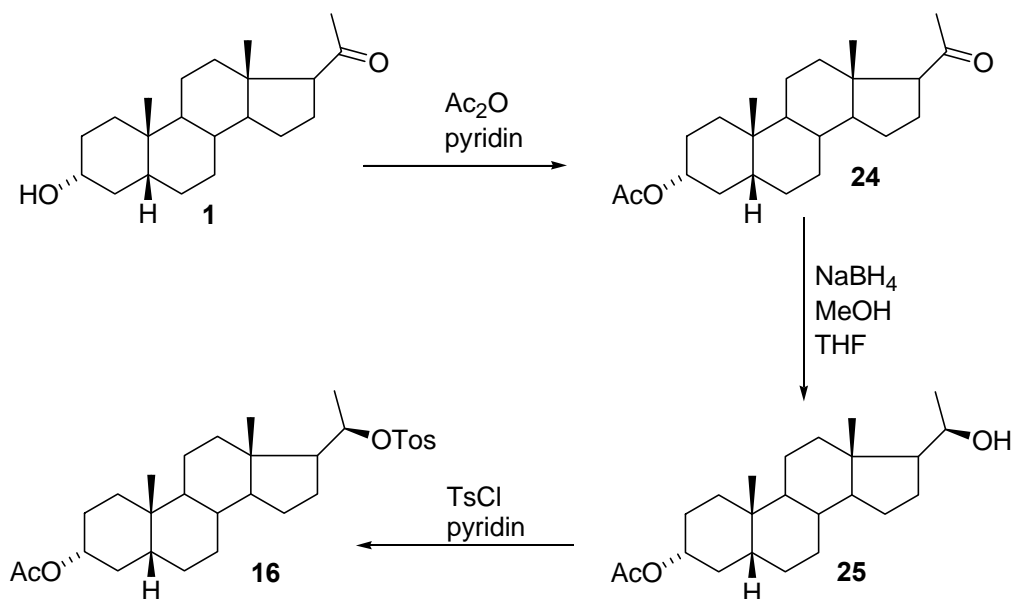
(2,43 s, 3 H, (Ar-CH₃)) ukazoval na navázání této skupiny, avšak dublet, který se objevil pro H-17a (4,16 d, 1 H, J=10,7 (H-17a)), dokazoval přesmyk (**Obr. 26**).



Obr. 26 Syntéza tosylátu 23

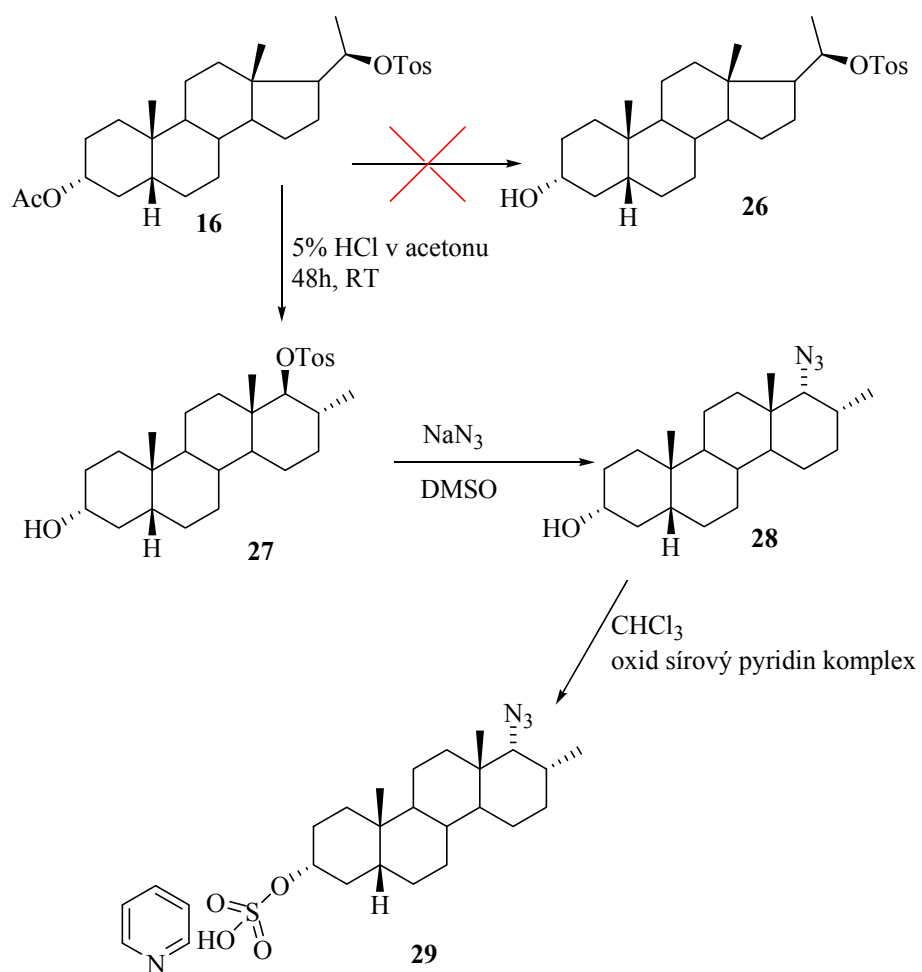
Kromě požadovaného derivátu 8 byla připravena další azido-sloučenina s modifikovaným kruhem D a vyšší afinitou k receptoru. K tomuto přesmyku na 6-ti členný D kruh vede sled reakcí (**Obr. 28**, str. 44), který vychází z (20*R*)-5β-pregnan-3α,20-diyl 3-acetátu, 20-tosylátu 16. Ten byl získán acetylací 3α,5β-pregnanolonu 1,

následovanou redukcí 20-ketonu **24** za vzniku alkoholu **25** a jeho aktivací tosylátem (**Obr. 27**).²⁶



Obr. 27 Syntéza (20*R*)-5β-Pregnan-3α,20-diyl 3-acetát,20-tosylátu **16**

Při pokusu o selektivní hydrolyzu acetátové skupiny v poloze C-3 (20*R*)-5β-pregnan-3α,20-diyl 3-acetát,20-tosylátu **16** 5% HCl v acetonu nevzniká produkt **26**, ale podle přítomnosti dubletu při δ 4,15 s interakční konstantou $J=10,7$ přesmyknutý derivát **27** s volnou hydroxylovou skupinou v pozici C-3 ve výtěžku 65 %. Vzhledem k tomu, že nová struktura slibovala zajímavou aktivitu, i z této látky byl připraven fotolabilní derivát **28** $\text{S}_{\text{N}}2$ substitucí tosylové skupiny azidem sodným. Volná hydroxylová skupina v poloze 3 poskytla reakci s komplexem pyridin - oxid sírový anionický derivát **29** ve výtěžku 60 %, vhodný pro základní elektrofyziologické stanovení inhibiční aktivity na NMDA receptoru (**Obr. 28**, str. 45).

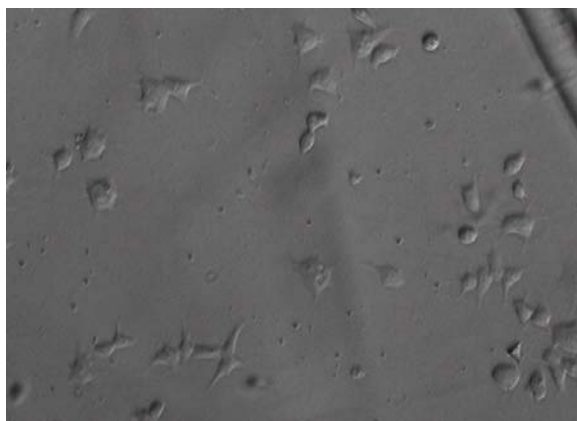


Obr. 28 Synt\u00e9za potenci\u00e1ln\u00e9ho inhib\u00edtoru **29** NMDA receptoru

4.2 Elektrofyzilogická část

4.2.1 Příprava buněk linie HEK293 exprimující NMDA receptory

Byly připraveny buňky exprimující NMDA receptory o podjednotkovém složení NR1-1a/NR2B. Buňky, které byly úspěšně transfekovány, bylo možné rozpoznat v mikroskopu díky současně se exprimujícímu eGFP. Na **Obr. 29** jsou znázorněny buňky pod mikroskopem pod přirozeným světlem, na **Obr. 30** jsou tytéž buňky pod filtrem, takže lze pozorovat pouze ty transfekované.



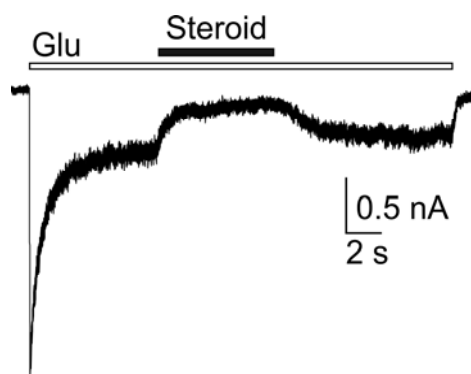
Obr. 29 Buňky pod přirozeným světlem



Obr. 30 Transfekované buňky

4.2.2 Hodnota IC_{50} pro steroid **8**

Inhibici NMDA receptoru steroidním derivátem (20*S*)-20-azido-5 β -pregnan-3 α -yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-L-glutamyl 1-ester (**8**) lze pozorovat na záznamu z měření (**Obr. 31**, str. 47), kde je dobře vidět snížení proudové odpovědi po aplikaci steroidu **8**.



Obr. 31 Záznam proudové odpovědi buňky po aplikaci glutamátu a následné koaplikaci steroidu 8

Pro výpočet relativní inhibice byly z grafů pro jednotlivé buňky odečteny hodnoty a, b (viz **Obr. 24**, str. 38), ze kterých byla vypočítána relativní inhibice (**Tab. 4**).

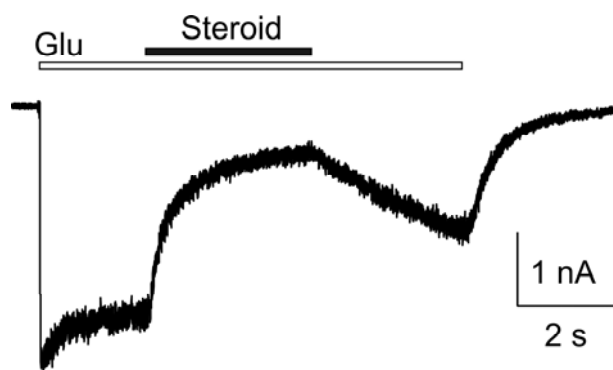
Tab. 4 Hodnoty a, b, a spočítané hodnoty relativní inhibice I a IC₅₀ pro steroid 8

	a [pA]	b [pA]	relativní inhibice I [%]	IC ₅₀ [μM]
Buňka 1	-960,0	-316,5	67,0	27,7
Buňka 2	-2310,0	-882,2	61,8	33,5
Buňka 3	-2005,0	-1040,6	48,1	53,3
Buňka 4	-597,0	-249,4	58,2	37,9
Buňka 5	-2483,0	-1311,9	47,2	54,9

Průměrná hodnota IC₅₀ pro steroid **8** je: IC₅₀ = 41,5 ± 12,1 μM při 50 μM. Hillův koeficient = 1,2. Statistická data byla zpracována v programu SigmaPlot 10.0.

4.2.3 Hodnota IC₅₀ pro steroid 29

Inhibici NMDA receptoru steroidním derivátem 17α-azido-17α-methyl-17a-homo-5β-androstan-3α-yl 3-sulfát pyridiniovou solí **29** můžeme vidět na záznamu z měření (**Obr. 32**, str. 48), kde je dobře vidět snížení proudové odpovědi po aplikaci steroidu **29**.



Obr. 32 Záznam proudové odpovědi buňky po aplikaci glutamátu a následné koaplikaci steroidu 29

Pro výpočet relativní inhibice byly z grafů pro jednotlivé buňky odečteny hodnoty a, b (viz **Obr. 23**, str. 38), ze kterých byla vypočítána relativní inhibice (**Tab. 5**).

Tab. 5 Hodnoty a, b, a spočítané hodnoty relativní inhibice I a IC_{50} pro steroid 29

	a [pA]	b [pA]	relativní inhibice I [%]	IC_{50} [μ M]
Buňka 1	-2813	-637	77,4	3,59
Buňka 2	-1415	-346	75,5	3,91
Buňka 3	-2400	-369	84,6	2,41
Buňka 4	-3795	-920	75,8	3,87
Buňka 5	-4835	-842	82,6	2,73

Průměrná hodnota IC_{50} pro steroid **29** je $IC_{50} = 3,3 \pm 0,7 \mu$ M při 10 μ M. Hillův koeficient = 1,2. Statistická data byla zpracována v programu SigmaPlot 10.0.

5. Diskuse

V rámci této diplomové práce byly stanoveny inhibiční aktivity charakterizované hodnotou IC_{50} pro dvě důležité syntetizované látky; a to pro fluorescenčně značený derivát **8** s pregnanovým skeletem a fotolabilní skupinou a pro derivát s přesmyknutým D kruhem **29**. Struktura první z uvedených sloučenin byla odvozena od přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu $3\alpha5\beta S$ inhibující NMDA receptor. Již v mé bakalářské práci, zabývající se touto problematikou bylo zjištěno, že nahrazení karbonylové skupiny v poloze 20 steroidního skeletu fotolabilní azidovou skupinou nesníží inhibiční účinek, vyvolaný neurosteroidem na aktivovaném NMDA receptoru.²⁶ Dalším požadavkem pro využití fotolabilních derivátů jako afinitních sond je možnost jejich snadné detekce. V současné době se upouští od použití radioaktivních izotopů a více se využívá fluorescenčních vlastností molekul. Protože deriváty steroidů fluorescenční nejsou, navázání vhodné fluorescenční značky bylo dalším krokem k syntéze potenciální sondy. Předběžné výsledky naší laboratoře ukázaly, že poměrně velké používané fluorescenční skupiny nejméně ovlivní aktivitu steroidních inhibitorů NMDA receptoru, pokud jsou navázány na spojovníku v oblasti kruhu A.

Jak již bylo uvedeno, obě cílové sloučeniny v elektrofyzilogických měřeních prokázaly schopnost inhibovat aktivovaný NMDA receptor. V steroidních modulátorech NMDA receptoru, studovaných na jiných pracovištích byla vždy přítomna karbonylová skupina v acetylovém postranním řetězci v poloze C-17 steroidního skeletu. Rovněž pro alosterické moduláty GABA receptoru je přítomnost této karbonylové skupiny nezbytným strukturním požadavkem.²⁷

Na rozdíl od těchto publikovaných výsledků námi připravené deriváty byly aktivní, přestože karbonylová skupina byla nahrazena v případě látky **8** azidem a u sloučeniny **29** dokonce postranní řetězec chyběl a neuhlíkatým substituentem byl místo karbonylového kyslíku opět azid. Aktivita se tímto zásahem do molekuly nejenže nesnížila, ale naopak byla vyšší než u endogenního prekurzoru. Lze předpokládat, že pro interakci s receptorem je důležitá nejen samotná struktura steroidního ligandu, ale také jeho lipofilicita. To by ukazovalo společně se složitější kinetikou inhibice na možné umístění vazebného místa pro steroidy na NMDA receptoru někde v těsné blízkosti buněčné membrány.

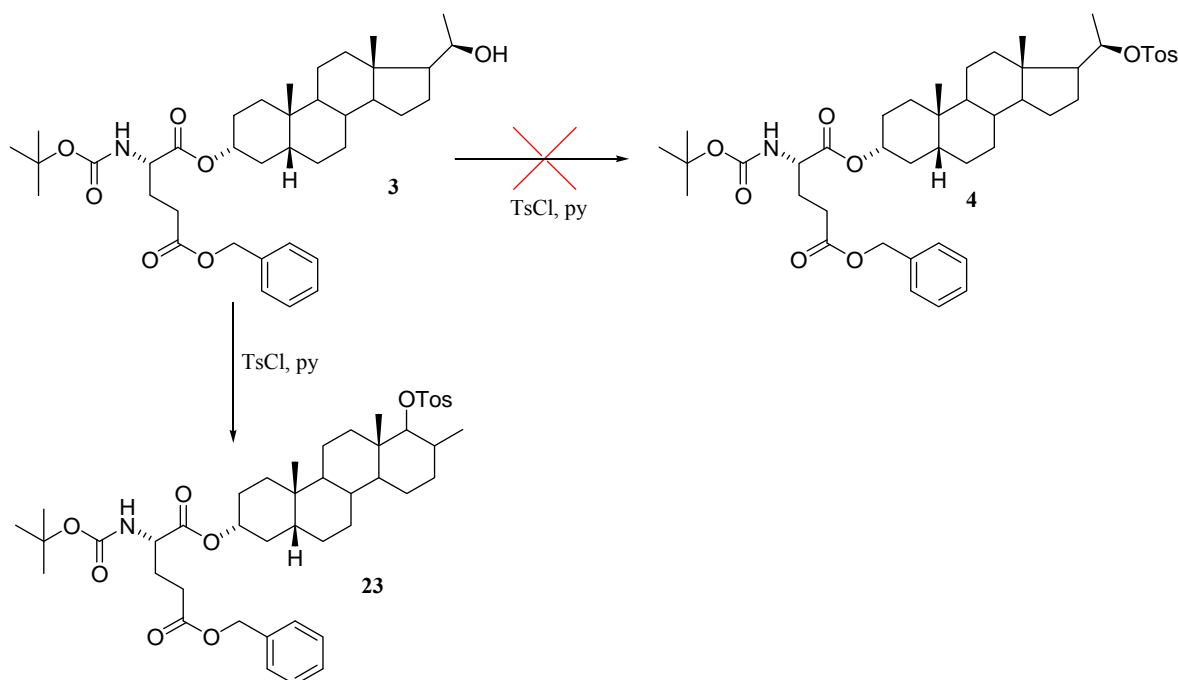
Pro tuto skutečnost svědčí také časová závislost proudové odpovědi buněk na aplikaci sloučenin **8** a **29**. Grafy závislosti se liší především ve fázi odmývání

aplikovaných látek. Derivát **29** se odmyvá pomaleji než fluorescenčně značená sloučenina **8**. Obě křivky představují děje, které jsou pravděpodobně složitější než prosté navázání do receptoru, jeho modulační a rychlé odmytí. Jistou úlohu zde může pravděpodobně hrát laterální transport buněčnou membránou, a tedy lipofilicita molekuly.

Možnost nahrazení sulfátové skupiny v poloze 3 jinou anionickou skupinou při zachování aktivity byla studována již dříve.²⁸ Připojení poměrně velké fluorescenční skupiny ve srovnání s dříve studovanými látkami aktivitu nevýznamně snižuje. To by mohlo naznačovat, že substituenty na kruhu A se nacházejí po navázání mimo štěrbinu receptoru.

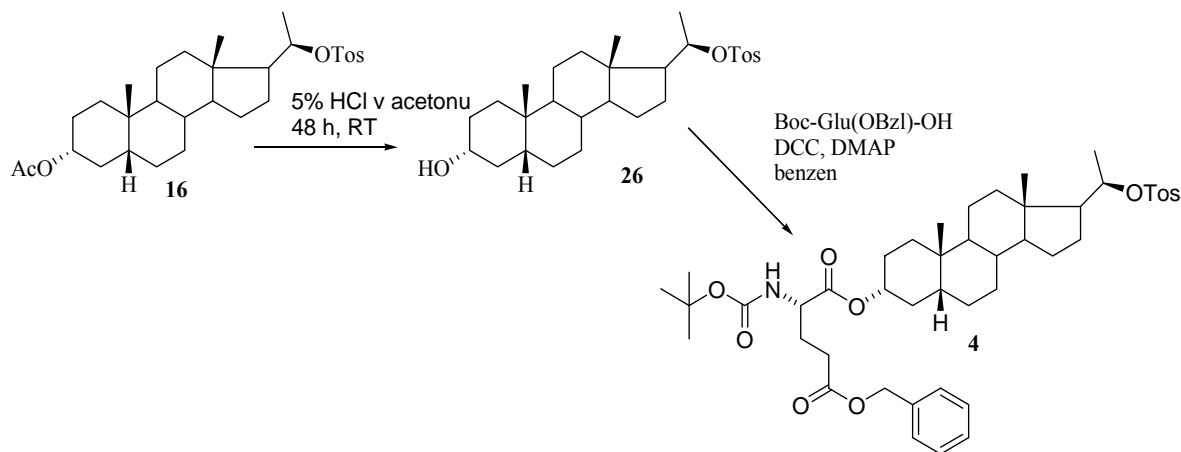
Na základě dosud zjištěných faktů zatím nelze úplně popsat celý složitý proces modulační NMDA receptoru steroidními sloučeninami. Pro porozumění tomuto ději jsou nezbytné další studie.

Syntéza fluorescenčně značeného derivátu **8** byla provázena komplikacemi, které spočívaly v přesmyku 5-ti členného D-kruhu na 6-ti členný. Při aktivaci hydroxylové skupiny v poloze C-20 derivátu **3** esterifikací *p*-toluensulfonovou byl předpokládán produktem tosylát **4**. Analýza ¹H NMR však vznik skeletu **4** nepotvrdila, naopak byl identifikován signál charakteristický pro přesmyknutý šestičlenný D-kruh (4,16 d, 1 H, *J*=10,7 (H-17a) (**Obr. 33**).



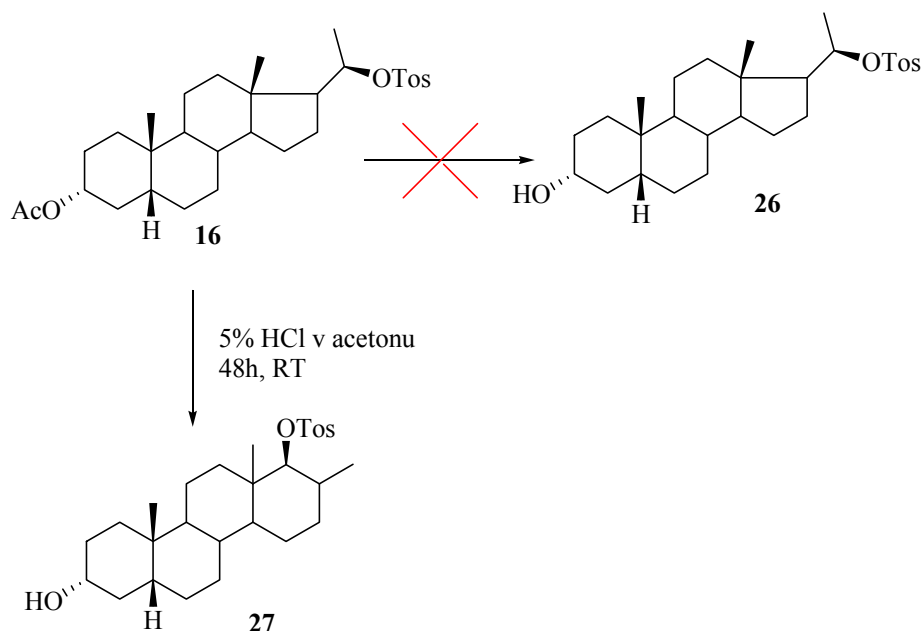
Obr. 33 Vznik přesmyknutého tosylátu **21**

K podobnému výsledku vedl další syntetický postup z (20*R*)-5β-pregnan-3α,20-diyl 3-acetátu, 20-tosylátu **16**, kdy při pokusu o selektivní hydrolýzu acetátu v poloze C-3 za vzniku alkoholu **26**, kterou měla následovat esterifikace ochráněnou kyselinou glutamovou (**Obr. 34**, str. 51)



Obr. 34 Plánovaná příprava látky **4** z tosylátu **16**

Docházelo také k přesmyku 5-ti členného D-kruhu na 6-ti členný za vzniku alkoholu **27**, který byl prokázán opět pomocí ^1H NMR (4,15 d, 1 H, $J=10,7$ (H-17a)) (**Obr. 35**).

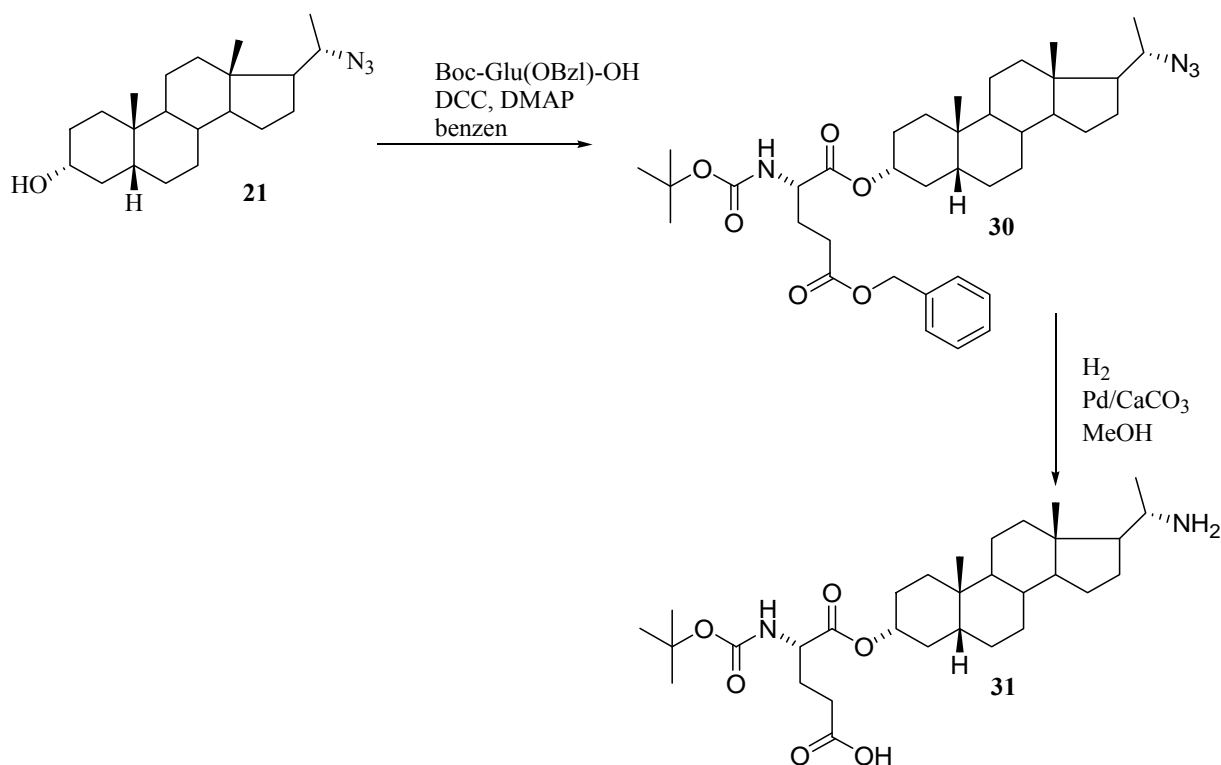


Obr. 35 Selektivní hydrolýza acetátu **16** vedoucí k přesmyku D-kruhu

Problém s přesmykem D-kruhu byl nakonec vyřešen nukleofilní substitucí (20*R*)-5β-pregnan-3α,20-diyl 3-acetát,20-tosylátu **16** za azid za vzniku látky **17** a následovaný

hydrolyzou acetátu a uvolněním hydroxylové skupiny v poloze C-3. Vzniklý alkohol **21** (Obr. 25, str.41.) pak byl esterifikován chráněnou kyselinou glutamovou.

V tomto případě nelze použít chránění ω -karboxylové skupiny benzylem (jako ve sloučenině **30**), protože standardní odchránění hydrogenací vodíkem na palladiovém katalyzátoru vede zároveň k redukci azidové skupiny na primární amin **31** (Obr. 36).



Obr. 36 Vznik aminu při obnovení karboxylové funkce

Proto byla při esterifikaci hydroxylové skupiny na C-3 látky **21** použita kyselina glutamová s ω -karboxylovou funkcí ochráněnou *tert*-butylovou skupinou, která tak vytvořila derivát **22**. *tert*-Butylová chránicí skupina ω -karboxylové funkce dále poskytovala výhodu jednokrokového obnovení jak ω -karboxylu, tak aminové skupiny ochráněné Boc – skupinou pomocí koncentrované kyseliny trifluoroctové. Byl získán odchráněný steroidní glutamát **7**, který následující konverzí s NBD-Cl poskytl konečný produkt **8** (Obr. 25, str. 41).

V posledních dnech průběhu prací bylo zjištěno, že ve srovnání s pregnanovým azidem **8** má D-homo derivát **29** větší inhibiční aktivitu na NMDA receptoru. Další postup ve vytváření afinitní sondy bude pokračovat na základě těchto získaných výsledků.

6. Souhrn

1. Byla připravena fotoafinitní fluorescenčně značená sonda (20*S*)-20-azido-5β-pregnan-3α-yl N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-L-glutamyl 1-esteru (**8**).
2. Na buňkách linie HEK293 exprimující NMDA receptory o podjednotkovém složení NR1-1a/NR2B byla stanovena hodnota IC₅₀ této fluorescenční sondy **8**, jejíž hodnota byla IC₅₀ = 41,5 ± 12,1 μM při 50 μM.
3. Byla připravena pyridiniová sůl sulfátu steroidu 17α-Azido-17α-methyl-17a-homo-5β-androstan-3α-yl 3-sulfát pyridiniové soli (29) s 6-ti členným D kruhem, jenž měl v pozici 17a navázanou azidovou skupinu. Na buňkách linie HEK293 exprimující NMDA receptory o podjednotkovém složení NR1-1a/NR2B byla stanovena hodnota IC₅₀ pro inhibici aktivovaného NMDAR. Hodnota byla: IC₅₀ = 3,3 ± 0,7 μM při 10 μM.

Seznam použité literatury

1. Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger – Principles of biochemistry*, 5th edition, W. H. Freeman Company, **2008**, str. 457.
2. Cais, O.; Vyklický, L. Jr: *Psychiatrie*, **2006**, 10 (Suppl.3), 8-11.
3. Dorda, M.; Vlček, K.; Chodounská, H.; Vyklický, L., Jr.: *Psychiatrie*, **2001**, 5 (Suppl.3), 5-9.
4. Gasior, M.; Carter, R. B.; Witkin, J. M.: *Trends Pharmacol. Sci.*, **1999**, 20, 107-112.
5. Obrázek byl převzat z <http://www.chrisparsons.de/Chris/images/NMDA.jpg>, 4.5.2011
6. Horák, M.; Vlček, K.; Chodounská, H.; Vyklický, L., Jr.: *Neuroscience*, **2006**, 137, 93-102.
7. Cais, O.; Adamusová, E.; Kořínek, M.; Borovská, J.; Vyklický, L., Jr.: *Psychiatrie*, **2009**, 13, 148-152.
8. Šťastná, E.: *Synthesis of Neurosteroids: Modulators of NMDA Receptor*, **2009**, kandidátská disertační práce PřF UK Praha, Katedra jaderné a organické chemie.
9. Bergmann, K. E.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A.: *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 141-150.
10. Kubíčková, B.; Hodek, P.: *Chem. Listy*, **2001**, 95, 359 – 364.
11. Lwowski W.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1980**, 346, 491-502.
12. Molleman, A.: *Patch clamping – An introductory guide to patch clamp electrophysiology*, John Willey and Sons Ltd, **2005**.
13. Obrázek převzatý z <http://www2.biomed.cas.cz/d331/>, 4.5.2011.
14. Lakowicz, R. L.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition, Springer, **2006**, str. 63-95.
15. Obrázek převzatý z <http://www.anaspec.com/products/product.asp?id=28876>, 4.5.2011
16. Nishimura, S.; Momma, Y.; Kawamura, H.; Shiota, M.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 780-783.
17. Soloway, A. H.; Deutsch, A. S.; Gallagher, T. F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 2356-2358.
18. Otera, J.; Nishikido J.: *Esterification: Methods, Reactions and Applications*, 2nd edition, John Willey and Sons Ltd, **2010**, str. 25.
19. Arce, P. M.; Rodriguez-Franco, I. M.; González-Munoz, G. C.; Pérez, C.; López, B.; Villarroya, M.; López, M. G.; García, A. G.; Conde, S.: *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 7249-7257.

20. Thompson, S. A.; Humphrey, G. R.; DeMarco, A. M.; Mathre, D. J.; Grabowski, E. J. J.: *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 5886-5888.
21. Leboeuf, M.; Cave, A.; Goutarel, R.: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1967**, 2100-2105.
22. Li, Ch.; Henry, E.; Mani, K. N.; Tang, J.; Brochon, J. C.; Deprez, E.; Xie, J.: *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 2395 – 2405.
23. Chong, H. S.; Song, H. A.; Lim, S.; Sun, X.; Mhaske, S. B.: *Chem. Commun.*, **2009**, 3011-3013.
24. Hollmann, M.; Boulter, J.; Maron, C.; Beasley, L.; Sullivan, J.; Pecht, G.; Heinmann, S.: *Neuron*, **1993**, 10, 943-953.
25. Monyer, H.; Sprengel, R.; Schoepfer, R.; Herb, A.; Higuchi, M.; Lomeli, H.; Burnashev, N.; Sakmann, B.; Seeburg, P. H.: *Science*, **1992**, 256, 1217-1221.
26. Vidrna, L.: *Neuroaktivní steroidy – syntéza potenciální fotoafinitní sondy*, **2009**, bakalářská práce, PŘF UK Praha, Katedra biochemie.
27. Akk, G.; Covey, D.F.; Evers, A. S.; Steinbach, J.H.; Zorumski, C.F.; Mennerick, S.: *Pharmacol. Ther.*, **2007**, 116, 35-37
28. Park-Chung, M.; Wu, F.S.; Purdy, R.H.; Malayev, A.A.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H.: *Mol. Pharmacol.*, **1997**, 52, 1113-1123

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka